



**PCT**  
WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM  
Internationales Büro  
INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation <sup>6</sup> : <b>C12N 15/52, 15/53, 15/54, 15/55, 15/81, 1/19, C12P 25/00 // (C12N 1/19, C12R 1:865)</b>		A2	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: <b>WO 95/26406</b>
		(43) Internationales Veröffentlichungsdatum:	5. Oktober 1995 (05.10.95)
(21) Internationales Aktenzeichen: <b>PCT/EP95/00958</b>		(81) Bestimmungsstaaten: CA, CN, JP, RU, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).	
(22) Internationales Anmeldedatum: <b>15. März 1995 (15.03.95)</b>			
(30) Prioritätsdaten: P 44 10 382.4      25. März 1994 (25.03.94)      DE P 44 20 785.9      15. Juni 1994 (15.06.94)      DE		Veröffentlicht <i>Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.</i>	
(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): BASF AKTIENGESELLSCHAFT [DE/DE]; D-67056 Ludwigshafen (DE).			
(72) Erfinder; und			
(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): REVUELTA DOVAL, Jose, Luis [ES/ES]; Pza. La Parra, 4, E-37001 Salamanca (ES). BUTRAGO SERNA, Maria, Jose [ES/ES]; Avenida de los Cedros, 33, E-37004 Salamanca (ES). SANTOS GARCIA, Maria, Angeles [ES/ES]; Versalles, 7, E-37009 Santa Marta (ES).			
(74) Gemeinsamer Vertreter: BASF AKTIENGESELLSCHAFT; D-67056 Ludwigshafen (DE).			

(54) Title: RIBOFLAVIN SYNTHESIS IN FUNGI

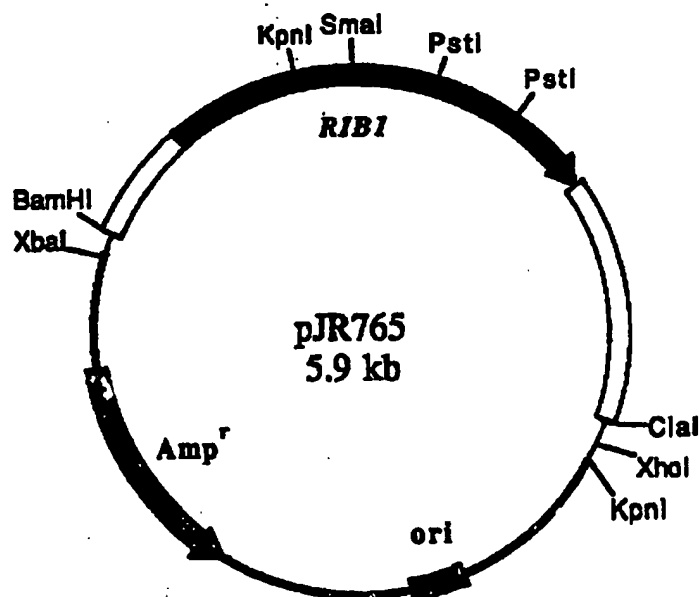
(54) Bezeichnung: RIBOFLAVIN-BIOSYNTHESE IN PILZEN

(57) Abstract

The invention concerns the riboflavin-biosynthesis genes in the fungus *Ashbya gossypii* as well as a method of producing riboflavin using these genes and gene products.

(57) Zusammenfassung

Die vorliegende Erfindung betrifft die Gene für Riboflavin-Biosynthese in dem Pilz *Ashbya gossypii* sowie gentechnische Verfahren zur Herstellung von Riboflavin unter Verwendung dieser Gene und Genprodukte.



# **LEDIGLICH ZUR INFORMATION**

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AT	Österreich	GA	Gabon	MR	Mauretanien
AU	Australien	GB	Vereinigtes Königreich	MW	Malawi
BB	Barbados	GE	Georgien	NE	Niger
BE	Belgien	GN	Guinea	NL	Niederlande
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	NO	Norwegen
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	NZ	Neuseeland
BJ	Benin	IE	Irland	PL	Polen
BR	Brasilien	IT	Italien	PT	Portugal
BY	Belarus	JP	Japan	RO	Rumänien
CA	Kanada	KE	Kenya	RU	Russische Föderation
CF	Zentrale Afrikanische Republik	KG	Kirgisistan	SD	Sudan
CG	Kongo	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SE	Schweden
CH	Schweiz	KR	Republik Korea	SI	Slowenien
CI	Côte d'Ivoire	KZ	Kasachstan	SK	Slowakei
CM	Kamerun	LI	Liechtenstein	SN	Senegal
CN	China	LK	Sri Lanka	TD	Tschad
CS	Tschechoslowakei	LU	Luxemburg	TG	Togo
CZ	Tschechische Republik	LV	Lettland	TJ	Tadschikistan
DE	Deutschland	MC	Monaco	TT	Trinidad und Tobago
DK	Dänemark	MD	Republik Moldau	UA	Ukraine
ES	Spanien	MG	Madagaskar	US	Vereinigte Staaten von Amerika
FI	Finnland	ML	Mali	UZ	Usbekistan
FR	Frankreich	MN	Mongolei	VN	Vietnam

## Riboflavin-Biosynthese in Pilzen

## Beschreibung

5

Die vorliegende Erfindung betrifft die Gene für Riboflavin-Biosynthese in Pilzen, die damit codierten Proteine sowie gentechnische Verfahren zur Herstellung von Riboflavin unter Verwendung dieser Gene und Genprodukte.

10

Die Herstellung von Riboflavin durch Fermentation von Pilzen wie *Eremothecium ashbyii* oder *Ashbya gossypii* ist bekannt (The Merck Index, Windholz et al., eds. Merck & Co., Seite 1183, 1983).

15 In der EP 405370 sind Riboflavin-überproduzierende Bakterienstämme beschrieben, die durch Transformation der Riboflavin-Biosynthese-Gene aus *Bacillus subtilis* erhalten wurden.

Da die Genetik der Riboflavin-Biosynthese in Bakterien und

20 Eukaryonten verschieden ist, sind die oben erwähnten Gene aus *Bacillus subtilis* nicht für ein rekombinantes Herstellungsverfahren für Riboflavin mit eukaryontischen Produktionsorganismen wie *Ashbya gossypii* geeignet.

25 In einer am 19.11.1992 beim Deutschen Patentamt eingereichten Patentanmeldung wurde die Klonierung der Riboflavin-Biosynthese Gene der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* beschrieben.

Eine Klonierung der *Ashbya gossypii* Riboflavin-Biosynthese Gene

30 unter Verwendung der *S. cerevisiae* RIB-Gene mit üblichen Hybridisierungsmethoden gelang jedoch nicht; offenbar war die Homologie der RIB-Gene aus *S. cerevisiae* und *A. gossypii* für eine Hybridisierung nicht groß genug.

35 Es bestand daher die Aufgabe, die Riboflavin-Biosynthese Gene aus einem Eukaryonten zu isolieren, um damit ein rekombinantes Herstellungsverfahren für Riboflavin in einem eukaryontischen Produktionsorganismus bereitzustellen.

40 Demgemäß wurden in dem Ascomyceten *Ashbya gossypii* sechs Gene (rib-Gene), die für Enzyme der Riboflavin-Biosynthese ausgehend von GTP codieren, gefunden und isoliert.

Die Erfindung betrifft die folgenden DNA-Sequenzen:

45

DNA-Sequenzen, die für ein Polypeptid mit der in SEQ ID NO: 2 dargestellten Aminosäuresequenz codieren oder für ein Analoges oder Derivat des Polypeptids gemäß SEQ ID NO: 2, worin eine oder mehrere Aminosäuren deletiert, hinzugefügt oder durch andere Aminosäuren substituiert worden sind, ohne die enzymatische Wirkung des Polypeptids wesentlich zu reduzieren.

DNA-Sequenzen, die für ein Polypeptid mit der in SEQ ID NO: 4 dargestellten Aminosäuresequenz codieren oder für ein Analoges oder Derivat des Polypeptids gemäß SEQ ID NO: 4, worin eine oder mehrere Aminosäuren deletiert, hinzugefügt oder durch andere Aminosäuren substituiert worden sind, ohne die enzymatische Wirkung des Polypeptids wesentlich zu reduzieren.

DNA-Sequenzen, die für ein Polypeptid mit der in SEQ ID NO: 6 dargestellten Aminosäuresequenz codieren oder für ein Analoges oder Derivat des Polypeptids gemäß SEQ ID NO: 6, worin eine oder mehrere Aminosäuren deletiert, hinzugefügt oder durch andere Aminosäuren substituiert worden sind, ohne die enzymatische Wirkung des Polypeptids wesentlich zu reduzieren.

DNA-Sequenzen, die für ein Polypeptid mit der in SEQ ID NO: 8 dargestellten Aminosäuresequenz codieren oder für ein Analoges oder Derivat des Polypeptids gemäß SEQ ID NO: 8, worin eine oder mehrere Aminosäuren deletiert, hinzugefügt oder durch andere Aminosäuren substituiert worden sind, ohne die enzymatische Wirkung des Polypeptids wesentlich zu reduzieren.

DNA-Sequenzen, die für ein Polypeptid mit der in SEQ ID NO: 10 dargestellten Aminosäuresequenz codieren oder für ein Analoges oder Derivat des Polypeptids gemäß SEQ ID NO: 10, worin eine oder mehrere Aminosäuren deletiert, hinzugefügt oder durch andere Aminosäuren substituiert worden sind, ohne die enzymatische Wirkung des Polypeptids wesentlich zu reduzieren.

DNA-Sequenzen, die für ein Polypeptid mit der in SEQ ID NO: 12 dargestellten Aminosäuresequenz codieren oder für ein Analoges oder Derivat des Polypeptids gemäß SEQ ID NO: 12, worin eine oder mehrere Aminosäuren deletiert, hinzugefügt oder durch andere Aminosäuren substituiert worden sind, ohne die enzymatische Wirkung des Polypeptids wesentlich zu reduzieren.

Die Gene und ihre Genprodukte (Polypeptide) sind im Sequenzprotokoll mit ihrer Primärstruktur aufgeführt und haben folgende Zuordnung:

SEQ ID NO: 1 : rib 1-Gen

- SEQ ID NO: 2 : rib 1-Genprodukt (GTP-cyclohydrolase II)  
SEQ ID NO: 3 : rib 2-Gen  
SEQ ID NO: 4 : rib 2-Genprodukt (DRAP-Deaminase)  
SEQ ID NO: 5 : rib 3-Gen  
5 SEQ ID NO: 6 : rib 3-Genprodukt (DBP-Synthase)  
SEQ ID NO: 7 : rib 4-Gen  
SEQ ID NO: 8 : rib 4-Genprodukt (DMRL-Synthase)  
SEQ ID NO: 9 : rib 5-Gen  
SEQ ID NO: 10: rib 5-Genprodukt (Riboflavin-Synthase)  
10 SEQ ID NO: 11: rib 7-Gen  
SEQ ID NO: 12: rib 7-Genprodukt (HTP-Reductase)

Guanosintriphosphat (GTP) wird durch GTP-Cyclohydrolase II (rib 1-Genprodukt) zu 2,5-Diamino-6-ribosylamino-4-(3H)-pyrimidinon-  
15 5-phosphat umgewandelt. Diese Verbindung wird anschließend durch rib 7-Genprodukt zu 2,5-Diamino-ribitylamino-2,4 (1H,3H)-pyrimidin-5-phosphat reduziert und dann durch rib 2-Genprodukt zum 5-Amino-6-ribitylamino-2,4 (1H,3H)-pyrimidindion deaminiert. Anschließend wird in einer rib 4-Genprodukt katalysierten Reaktion die C4-Verbindung DBP hinzugefügt und es entsteht  
20 6,7-Dimethyl-8-ribityllumazin (DMRL), aus dem in der rib 5-Genprodukt katalysierten Reaktion Riboflavin entsteht. Die C4-Verbindung DBP (L-3,4-Dihydroxy-2-butanon-4-phosphat) wird aus D-Ribulose-5-phosphat in einer rib 3-Genprodukt katalysierten  
25 Reaktion gebildet.

Die in SEQ ID NO: 1,3,5,7,9,11 beschriebenen DNA-Sequenzen codieren für die Polypeptide, die in SEQ ID NO: 2,4,6,8,10,12 beschrieben sind.

30

Außer den im Sequenzprotokoll genannten DNA-Sequenzen sind auch solche geeignet, die infolge der Degeneration des genetischen Codes eine andere DNA Sequenz besitzen, jedoch für das gleiche Polypeptid codieren.

35

Weiterhin sind auch solche DNA Sequenzen Gegenstand der Erfindung, die für ein Genprodukt (Polypeptid) mit anderer als der im Sequenzprotokoll aufgeführten Primärstruktur codieren, solange das Genprodukt noch im wesentlichen die gleichen biologischen Eigenschaften wie das im Sequenzprotokoll genannte Genprodukt besitzt. Unter biologischen Eigenschaften sind vor allem die die Biosynthese von Riboflavin bewirkenden enzymatischen Aktivitäten zu verstehen.

40

45 Solche veränderten Genprodukte mit im wesentlichen gleichen biologischen Eigenschaften sind durch Deletion oder Hinzufügen von einer oder mehreren Aminosäuren oder Peptiden oder durch Aus-

tausch von Aminosäuren durch andere Aminosäuren erhältlich oder können aus anderen Organismen als *Ashbya gossypii* isoliert werden.

- 5 Die DNA-Sequenzen, die für die veränderten Genprodukte codieren, sind zu den DNA-Sequenzen gemäß Sequenzprotokoll in der Regel zu 80 oder mehr Prozent homolog. Solche DNA-Sequenzen lassen sich ausgehend von den in SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11 beschriebenen DNA-Sequenzen, beispielsweise mit üblichen Hybridisierverfahren
- 10 oder der PCR-Technik aus anderen Eukaryonten als *Ashbya gossypii* isolieren. Diese DNA-Sequenzen hybridisieren unter Standardbedingungen mit den in SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11 beschriebenen DNA-Sequenzen.
- 15 Unter Standardbedingungen sind beispielsweise Temperaturen zwischen 42 und 58°C in einer wäßrigen Pufferlösung mit einer Konzentration zwischen 0,1 und 1 x SSC (1 x SSC: 0,15M NaCl, 15mM Natriumcitrat pH 7,2) zu verstehen. Die experimentellen Bedingungen für DNA-Hybridisierungen sind in Lehrbüchern der Gentechnik,
- 20 beispielsweise in Sambrook et al., "Molecular Cloning", Cold Spring Harbor Laboratory, 1989, beschrieben.

- Ein weiterer Gegenstand der Erfindung sind Regulationssequenzen, insbesondere Promotorsequenzen, die in 5'-Richtung vor den für
- 25 die entsprechenden Polypeptid codierenden DNA-Sequenzen liegen. Die Regulationssequenzen sind im Sequenzprotokoll aufgeführt und im folgenden näher erläutert.

Regulationssequenz für rib 1-Gen:

- 30 SEQ ID NO: 1 Nukleotid 1-242

Regulationssequenz für rib 2-Gen:

SEQ ID NO: 3 Nukleotid 1-450

- 35 Regulationssequenz für rib 3-Gen:

SEQ ID NO: 5 Nukleotid 1-314

Regulationssequenz für rib 4-Gen:

SEQ ID NO: 7 Nukleotid 1-270

40

Regulationssequenz für rib 5-Gen:

SEQ ID NO: 9 Nukleotid 1-524

Regulationssequenz für rib 7-Gen:

- 45 SEQ ID NO: 11 Nukleotid 1-352

Die Regulationssequenzen können auch noch in 5'- und/oder 3'-Richtung verkürzt werden, ohne daß ihre Funktion wesentlich nachläßt.

- 5 Essentiell für die Regulationswirkung sind in der Regel Fragmente von 30 bis 100, bevorzugt 40 bis 70 Nukleotiden aus den oben angegebenen Sequenzbereichen.

Diese Regulationssequenzen können auch durch gerichtete

- 10 Mutagenese im Vergleich zu den natürlichen Sequenzen in ihrer Funktion optimiert werden.

Die erfindungsgemäßen Regulationssequenzen eignen sich für die Überexpression von Genen in Ashbya, insbesondere von Genen, die

- 15 für die Riboflavin-Biosynthese verantwortlich sind.

Weiterhin sind Gegenstand der Erfindung Expressionsvektoren, die eine oder mehrere der erfindungsgemäßen DNA-Sequenzen enthalten. Solche Expressionsvektoren erhält man, indem man die erfindungs-

- 20 gemäßen DNA-Sequenzen mit geeigneten funktionellen Regulationssignalen versieht. Solche Regulationssignale sind DNA-Sequenzen, die für die Expression verantwortlich sind, beispielsweise Promotoren, Operatoren, Enhancer, ribosomale Bindungsstellen, und die vom Wirtsorganismus erkannt und bedient werden.

25

Gegebenenfalls können noch weitere Regulationssignale, die beispielsweise Replikation oder Rekombination der rekombinanten DNA im Wirtsorganismus steuern, Bestandteil des Expressionsvektors sein.

30

Ebenso gehören die mit den erfindungsgemäßen DNA-Sequenzen oder Expressionsvektoren transformierten Wirtsorganismen zum Gegenstand der Erfindung. Bevorzugt werden als Wirtsorganismen eukaryontische Organismen, besonders bevorzugt solche der Gattung

- 35 Saccharomyces, Candida, Pichia, Eremothecium oder Ashbya verwendet. Besonders bevorzugte Arten sind Saccharomyces cerevisiae, Candida flaveri, Candida famata, Eremothecium ashbyii und Ashbya gossypii.

- 40 Weiterhin gehört zur Erfindung ein rekombinantes Herstellungsverfahren für Riboflavin, in dem die erfindungsgemäßen transformierten Wirtsorganismen in an sich bekannter Weise durch Fermentation gezüchtet werden und das während der Fermentation gebildete Riboflavin aus dem Fermentationsmedium isoliert und
- 45 gegebenenfalls gereinigt wird.

Die rib<sup>-</sup>-Gene und -Genprodukte lassen sich wie im Beispiel und im Sequenzprotokoll beschrieben isolieren und charakterisieren.

#### Beispiel 1

#### 5 Isolierung der *Ashbya gossypii* Riboflavin Biosynthese Gene (rib-Gene)

##### a. Konstruktion einer *Ashbya gossypii* cDNA-Bank

10 Gesamt RNA wurde aus dem Mycel des Riboflavin überproduzierenden Stammes *Ashbya gossypii* ATCC 10195 nach Züchtung auf YEPD Medium (Sherman et al., "Methods in yeast genetics", Cold Spring Harbor, New York, 1989) in der späten logarithmischen Wachstumsphase extrahiert.

15

Poly(A)<sup>+</sup> RNA wurde durch zweimalige Adsorption und Elution an oligo(dT)-Cellulose gereinigt (Aviv und Leder, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69, 1972, 1408-1412). Die cDNA wurde nach der allgemeinen Vorschrift von Gubler und Hoffmann isoliert (Gene 25, 1983, 263)

20 und synthetische EcoRI-Adaptoren wurden an die Enden der blunt-end cDNA-Moleküle hinzugefügt. Die EcoRI nachgeschnittenen cDNA Fragmente wurden anschließend mittels T4 Polynukleotidkinase phosphoryliert und in den dephosphorylierten EcoRI geschnittenen Vektor pYEura3 kloniert (Fig. 1). pYEura3 (Clonetech

25 Laboratories, Inc., Kalifornien) ist ein Hefe-Expressionsvektor, der die Galaktose-induzierbaren GAL1 und GAL10 Promotoren und URA, CEN4 und ARS1 beinhaltet. Diese Hefeelemente erlauben die Transformation und Expression klonierter DNA-Fragmente in Hefezellen.

30

Aliquots der Ligationsreaktion wurden benutzt um hochkompetente (Hanahan, DNA Cloning, ed. D.M. Glover; IRL Press, Oxford 1985, 109) *E. coli* XL1-Blue (Bullock et al., Biotechniques 5 (1987) 376-378) zu transformieren und Transformanten wurden auf Basis

35 ihrer Ampicillinresistenz selektioniert.

Etwa  $3 \times 10^5$  ampicillinresistente Zellen wurden vereinigt, amplifiziert und daraus Plasmid-DNA isoliert (Birnboim und Doly, Nucleic Acids Res. 7, 1979, 1513).

40

b. Isolierung von *Ashbya gossypii* cDNA-Klonen, die für riboflavinbildende Enzyme codieren

45



cDNA-Klone von *Ashbya gossypii*, die für riboflavinbildende Enzyme codieren, wurden durch funktionelle Komplementation von *Saccharomyces cerevisiae* Mutanten, die in der Riboflavin-Biosynthese betroffen sind, isoliert.

5

Die Stämme AJ88 (Mata leu2 his3 rib1::URA3 ura3-52), AJ115 (Matalpha leu2 inos1 rib2::URA3 ura3-52), AJ71 (Matalpha leu2 inos1 rib3::URA3 ura3-52), AJ106 (Matalpha leu2 inos1 rib4::URA3 ura3-52), AJ66 (Mata canR inos1 rib5::URA3 ura3-52) und AJ121

- 10 (Matalpha leu2 inos1 rib7::URA3 ura3-52) sind mutierte Stämme, die durch Zerstörung eines der sechs Gene (RIB1 bis RIB5 und RIB7), die in die Riboflavinbiosynthese bei *Saccharomyces cerevisiae* involviert sind.

- 15 Diese Stämme wurden jeweils mit 25 µg cDNA aus der *Ashbya gossypii* cDNA-Bank transformiert und auf festem Galaktose-haltigem Medium ohne Riboflavin ausplattiert. Nach ungefähr einer Woche Wachstum wurden Rib+ Transformanten von den Kulturschalen isoliert.

- 20 Jeweils eine Transformante von jeder transformierten Mutante (Rib1+, Rib2+, Rib3+, Rib4+, Rib5+ und Rib7+) wurde analysiert und in allen Fällen wurde gefunden, daß der Rib+ Phänotyp nur in Galaktosemedium, nicht jedoch in Glucosemedium exprimiert war.

- 25 Diese Ergebnisse belegen, daß der Rib+ Phänotyp unter der Kontrolle des plasmidständigen galaktoseinduzierbaren GAL10 Promotors exprimiert wurde.

Plasmid-DNA wurde aus den Rib1+, Rib2+, Rib3+, Rib4+, Rib5+ und

- 30 Rib7+ Transformanten durch Transformation von *E. coli* isoliert und pJR715, pJR669, pJR788, pJR733, pJR681 und pJR827 genannt.

Partialsequenzierung der in diesen Plasmiden enthaltenen cDNA-Insertionen bestätigte, daß sie für Proteine codieren, die analog

- 35 zu Proteinen der Rib-Genprodukte aus *Saccharomyces* sind.

c. Isolierung von *Ashbya gossypii* genomischen Klonen, die für riboflavinbildende Enzyme codieren

- 40 Um die genomischen Kopien der riboflavinbildenden Gene von *Ashbya gossypii* zu isolieren wurde eine genomische Bank von *Ashbya gossypii* ATCC 10195 in dem Cosmid superCos1 (Stratagene Cloning Systems, Kalifornien) angelegt und mit <sup>32</sup>P-markierten Proben, die von den cDNA Kopien der RIB1, RIB2, RIB3, RIB4, RIB5 und RIB7

- 45 Gene von *Ashbya gossypii* abgeleitet waren, gescreent.

Cosmid Klone mit RIB1, RIB2, RIB3, RIB4, RIB5 und RIB7 DNA wurden isoliert durch Koloniehybridisierung (Grunstein und Hogness, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72, 1975, 3961-3965). Weitere Southern Analysen von enzymatisch gespaltener Cosmid DNA unter Verwendung  
5 der gleichen RIB-spezifischen cDNA Proben erlaubte die Identifizierung definierter Restriktionsfragmente, die die RIB1, RIB2, RIB3, RIB4, RIB5 und RIB7 Gene von *Ashbya gossypii* enthielten.

Ein 3,1 kb langes BamHI-ClaI DNA Fragment wurde gefunden, das das  
10 gesamte RIB1 Gen von *Ashbya gossypii*, codierend für GTP-Cyclohydrolase II enthielt. Dieses Fragment wurde aus einem Agarose Gel isoliert und in den BamHI und ClaI geschnittenen pBluescript KS (+) phagemid (Stratagene Cloning Systems) kloniert und lieferte so das Plasmid pJR765 (Fig.2).

15 Eine 1329 bp lange DNA Sequenz wurde erhalten (SEQ ID NO:1), die den RIB1 offenen Leserahmen von 906 bp, 242 bp von der 5'-nichtkodierenden Region und 181 bp von der 3'-nichtkodierenden Region enthielt.

20 Das gesamte *Ashbya gossypii* RIB2 Gen, das für die DRAP-Deaminase codiert, wurde auf einem 3,0 kb langen EcoRI-PstI Fragment gefunden, das kloniert in pBluescript KS (+) das Plasmid pJR758 ergab (Fig.3).

25 Eine 2627 bp lange Region der EcoRI-PstI-Insertion mit dem offenen Leserahmen von RIB2 von 1830 bp, 450 bp der 5'-untranslatierten Region und 347 bp der 3'-untranslatierten Region wurde sequenziert (SEQ ID NO:3).

30 Das gesamte *Ashbya gossypii* RIB3 Gen, das für die DBP-Synthase codiert, wurde auf einem 1,5 kb langen PstI-HindIII Fragment gefunden, das kloniert in pBluescript KS (+) das Plasmid pJR790 ergab (Fig.4).

35 Eine 1082 bp lange Region der PstI-HindIII-Insertion mit dem offenen Leserahmen von RIB3 von 639 bp, 314 bp der 5'-untranslatierten Region und 129 bp der 3'-untranslatierten Region wurde sequenziert (SEQ ID NO:5).

40 Das *Ashbya gossypii* RIB4 Gen, das für die DMRL-Synthase codiert, wurde auf einem 3,2 kb langen PstI-PstI Fragment gefunden, das kloniert in pBluescript KS (+) das Plasmid pJR762 ergab (Fig.5).

45

Eine 996 bp lange Region der PstI-PstI-Insertion mit dem offenen Leserahmen von RIB4 von 519 bp, 270 bp der 5'-untranslatierten Region und 207 bp der 3'-untranslatierten Region wurde sequenziert (SEQ ID NO:7).

5

Das gesamte *Ashbya gossypii* RIB5 Gen, das für die Riboflavin-Synthase codiert, wurde auf einem 2,5 kb langen PstI-PstI Fragment gefunden, das kloniert in pBluescript KS (+) das Plasmid PJR739 (Fig.6) ergab.

10

Eine 1511 bp lange Region der PstI-PstI-Insertion mit dem offenen Leserahmen von RIB5 von 708 bp, 524 bp der 5'-untranslatierten Region und 279 bp der 3'-untranslatierten Region wurde sequenziert (SEQ ID NO:9).

15

Schließlich wurde das *Ashbya gossypii* RIB7 Gen, das für die HTP-Reduktase codiert, auf einem 4,1 kb langen EcoRI-EcoRI-Fragment gefunden, das kloniert in pBluescript KS (+) das Plasmid PJR845 ergab (Fig.7).

20

Eine 1596 bp lange Region der EcoRI-EcoRI-Insertion mit dem offenen Leserahmen von RIB7 von 741 bp, 352 bp der 5'-untranslatierten Region und 503 bp der 3'-untranslatierten Region wurde sequenziert (SEQ ID NO:11).

25

Beispiel 2

mRNA Analyse der *Ashbya gossypii* RIB-Gene

- 30 Um die RIB spezifischen Transkripte zu identifizieren wurden Northern Analysen durchgeführt. Gesamt RNA wurde aus dem *Ashbya gossypii* Stamm ATCC 10195 wie in Beispiel 1 beschrieben, isoliert. Die RNA Proben des Stammes (5 µg) wurden elektrophoretisch aufgetrennt auf 0,8% Agarose-Formaldehyd-Gelen zusammen mit RNA-Größenmarkern und unter Vakuum auf Nylonmembrane geblottet (Thomas, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77, 1980, 5201-5205).

- 40 Die Nylonmembranen wurden unabhängig voneinander mit <sup>32</sup>P-markierten RIB-spezifischen DNA-Proben bei 42°C in 5xSSC und in Gegenwart von 50 % Formamid hybridisiert. Das *Ashbya gossypii* RIB1 Gen wird als unique Message von etwa 1150 Nukleotiden exprimiert, was in beiden Stämmen durch eine 0,7 kbp lange SmaI-SacI Probe aus dem Plasmid pJR765 (Fig. 8) nachgewiesen wurde.

- 45 Analog wurden unique 1900 Nukleotide lange RIB2-, 900 Nukleotide lange RIB3-, 800 Nukleotide lange RIB4-, 1050 Nukleotide lange RIB5- und 1000 Nukleotide lange RIB7-Transkripte in den Blots mit

Hilfe eines 0,5 kbp langen SmaI-SmaI-Fragments aus pJR758, eines 0,6 kbp langen HindIII-KpnI-Fragments aus pJR790, eines 0,5 kbp langen ScaI-HindIII Fragments aus pJR739 und eines 0,3 kbp langen PstI-PstI-Fragments aus pJR845 als spezifischer Probe nachge-  
5 wiesen.

### Beispiel 3

Expression der *Ashbya gossypii* RIB-Gene in *Saccharomyces*  
10 *cerevisiae*

Wie in Beispiel 1 beschrieben, können gut untersuchte Mutanten von *Saccharomyces cerevisiae*, die in einer Stufe der Riboflavinbiosynthese defekt sind, auf Kulturmedien ohne Riboflavin wach-  
15 sen, wenn sie ein Plasmid tragen, das für die komplementierenden Enzyme von *Ashbya* codiert. Um die Funktion der *Ashbya gossypii* RIB Genprodukte zu testen wurden flavinbildende Enzymaktivitäten in zellfreien Extrakten von *S. cerevisiae*- Mutanten gemessen, die eines der Expressionsplasmide pJR715, pJR669, pJR788, pJR733,  
20 pJR681 und pJR827 trugen.

Diese in Beispiel 1 beschriebenen von pYEura3 abgeleiteten Plasmide enthalten *Ashbya gossypii* RIB-spezifische cDNA-Fragmente unter der Kontrolle des galaktoseinduzierbaren GAL10 Promotors.  
25

Zellfreie Proteinextrakte von *S. cerevisiae* wurden aus Kulturen gewonnen, die in Flüssigmedium bis zu einer optischen Dichte von etwa 2 OD gewachsen waren.

30 Die Zellen wurden geerntet, mit kaltem 20 mM Tris HCl, pH 7,5 gewaschen und im gleichen Puffer, der mit 1 mM Phenylethylsulfonylfluorid supplementiert war, resuspendiert.

Zell-Lysate wurden durch Vortexen in Gegenwart von Glaskugeln und  
35 Zentrifugation bei 3000 g für 20 min. bei 4°C hergestellt.

GTP-Cyclohydrolase II, DRAP-Deaminase, DBP-Synthase, DMRL-Synthase, Riboflavin-Synthase und HTP-Reduktase Enzymaktivitäten wurden bestimmt wie in der Literatur beschrieben (Shavlovsky et  
40 al, Arch. Microbiol. 124 1980, 255-259; Richter et al., J. Bacteriol. 175, 1993, 4045-4051; Klein und Bacher, Z. Naturforsch. 35b, 1980, 482-484; Richter et al. J. Bacteriol. 174, 1992, 4050-4056; Nielsen et al. J. Biol. Chem. 261, 1986, 3661; Plaut und Harvey, Methods Enzymol. 18B, 1971, 515-538; Hollander und  
45 Brown, Biochem. Biophys. Res. Commun. 89, 1979, 759-763; Shavlovski et al., Biochim. Biophys. Acta, 428, 1976, 611-618).

Protein wurde nach der Methode von Peterson quantifiziert (Anal. Biochem. 83, 1977, 346-356). Wie aus Tab. 1 ersichtlich, bewirkt das Plasmid pJR715 die Expression von GTP-Cyclohydrolase II Aktivität in der *S. cerevisiae* Mutante AJ88. Weiterhin ist diese Aktivität nur vorhanden in Zellen, die auf Galaktosemedium gewachsen sind, was darauf hinweist, daß die RIB1 cDNA Expression von *Ashbya gossypii* unter der Kontrolle des galaktoseinduzierbaren GAL10-Promotors erfolgt.

10 Daher belegen diese Ergebnisse, daß RIB1 für die GTP-Cyclohydrolase II in *Ashbya gossypii* codiert. Auf analoge Art wurde gezeigt, daß RIB2 für DRAP-Deaminase, RIB3 für DBP-Synthase, RIB4 für DMRL-Synthase, RIB5 für Riboflavinsynthase und RIB7 für HTP-Reduktase in diesem Pilz codiert.

15

Tab. 1

GTP-Cyclohydrolase II Aktivität der *S. cerevisiae* RIB1 Mutante AJ88 und ihrer Transformanten.

20	Stamm	Plasmid	GTP-Cyclohydrolase II U/mg Protein **)	
			Glucose	Galaktose
	X 2180-1A*	-	0,48	0,34
	AJ 88	-	n.d.	n.d.
25	AJ 88	pIR715	n.d.	21,60

n.d.: not detected

\*) Wildtyp

\*\*) Einheiten GTP-Cyclohydrolase II Aktivitäten  
1U katalysiert die Bildung von 1 nmol HTP pro Stunde

30

35

40

45

Tab.2  
DRAP-Deaminase Aktivität der *S. cerevisiae* RIB2 Mutante AJ115 und ihrer Transformanden.

5	Stamm	Plasmid	DRAP-Deaminase U/mg Protein *)	
			Glucose	Galaktose
	X 2180-1A	-	0,45	0,38
	AJ 115	-	n.d.	n.d.
10	AJ 115	pIR669	n.d.	53,22

n.d.:not detected

\*) 1U katalysiert die Bildung von 1 nmol ARAP pro Stunde

Tab.3  
DBP-Synthase Aktivität der *S. cerevisiae* RIB3 Mutante AJ71 und ihrer Transformanden.

20	Stamm	Plasmid	DBP-Synthase U/mg Protein *)	
			Glucose	Galaktose
	X 2180-1A	-	0,80	0,75
	AJ 71	-	n.d.	n.d.
	AJ 71	pIR788	n.d.	25,19

25 n.d.:not detected

\*) 1U katalysiert die Bildung von 1 nmol DBP pro Stunde

Tab.4  
GTP-Cyclohydrolase II Aktivität der *S. cerevisiae* RIB4 Mutante AJ106 und ihrer Transformande.

35	Stamm	Plasmid	DMRL-Synthase U/mg Protein *)	
			Glucose	Galaktose
	X 2180-1A	-	2,04	1,73
	AJ 106	-	n.d.	n.d.
	AJ 106	pIR733	n.d.	86,54

n.d.:not detected

\*) 1U katalysiert die Bildung von 1 nmol DMRL pro Stunde

Tab.5

Riboflavin-Synthase Aktivität der *S. cerevisiae* RIB5 Mutante AJ66 und ihrer Transformande.

5	Stamm	Plasmid	Riboflavin-Synthase U/mg Protein *)	
			Glucose	Galaktose
	X 2180-1A	-	4,41	3,80
	AJ 66	-	n.d.	n.d.
10	AJ 66	pIR681	n.d.	164,20

n.d.:not detected

\*) 1U katalysiert die Bildung von 1 nmol Riboflavin pro Stunde

Tab.6

15 HTP-Reduktase Aktivität der *S. cerevisiae* RIB7 Mutante AJ121 und ihrer Transformande.

20	Stamm	Plasmid	HTP-Reductase U/mg Protein *)	
			Glucose	Galaktose
	X 2180-1A	-	1,86	2,54
	AJ 121	-	n.d.	n.d.
	AJ 121	pIR827	n.d.	46,21

25 n.d.:not detected

\*) 1U katalysiert die Bildung von 1 nmol DRAP pro Stunde

30

35

40

45

## SEQUENZPROTOKOLL

## (1) ALGEMEINE INFORMATION:

## (i) ANMELDER:

- (A) NAME: BASF Aktiengesellschaft
- (B) STRASSE: Carl-Bosch-Strasse 38
- (C) ORT: Ludwigshafen
- (E) LAND: Bundesrepublik Deutschland
- (F) POSTLEITZAHL: D-67056
- (G) TELEPHON: 0621/6048526
- (H) TELEFAX: 0621/6043123
- (I) TELEX: 1762175170

(ii) ANMELDETITEL: Riboflavin-Biosynthese in Pilzen

(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 12

## (iv) COMPUTER-LESBARE FORM:

- (A) DATENTRÄGER: Floppy disk
- (B) COMPUTER: IBM PC compatible
- (C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
- (D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.25 (EPA)

## (2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 1:

## (i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 1329 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Doppel
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNS zu mRNS

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iii) ANTISENSE: NEIN

## (vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

- (A) ORGANISMUS: Ashbya gossypii

## (ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: 5'UTR
- (B) LAGE: 1..242

## (ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
- (B) LAGE: 243..1148

## (ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: 3'UTR
- (B) LAGE: 1149..1329

## (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:

TTTCTGTCCG CATACTTCAT ATGCTCATCG CACATTGATA ATGTACATTC GAAAAATTC	60
AAGATTAGCC TCCGTGAACA GCGATTTACC TTAGGCAAAA GTAACAAAAG GCTTTTCCGT	120
AGGTGCTTTG TCATTCAACA ATCCACGTCG GAATTGGCGA CTATATAGTG TAGGGCCCAT	180
AAAGCAGTAG TCGGTGTTGA TAGCTGTGTC AGACCAACTC TTTGTTAATT ACTGAAGCTG	240
AT ATG ACT GAA TAC ACA GTG CCA GAA GTG AGG TGT GTC GCA CGC GCG	287
Met Thr Glu Tyr Thr Val Pro Glu Val Arg Cys Val Ala Arg Ala	



15

CGC	ATA	CCG	ACG	GTA	CAG	GGC	ACC	GAT	GTC	TTC	CTC	CAT	CTA	TAC	CAC	335
Arg	Ile	Pro	Thr	Val	Gln	Gly	Thr	Asp	Val	Phe	Leu	His	Leu	Tyr	His	
				20					25					30		
AAC	TCG	ATC	GAC	AGC	AAG	GAA	CAC	CTA	GCG	ATT	GTC	TTC	GGC	GAG	AAC	383
Asn	Ser	Ile	Asp	Ser	Lys	Glu	His	Leu	Ala	Ile	Val	Phe	Gly	Glu	Asn	
			35					40					45			
ATA	CGC	TCG	CGG	AGT	CTG	TTC	CGG	TAC	CGG	AAA	GAC	GAC	ACG	CAG	CAG	431
Ile	Arg	Ser	Arg	Ser	Leu	Phe	Arg	Tyr	Arg	Lys	Asp	Asp	Thr	Gln	Gln	
		50					55				60					
GCG	CGG	ATG	GTG	CGG	GGC	GCC	TAC	GTG	GGC	CAG	CTG	TAC	CCC	GGG	CGG	479
Ala	Arg	Met	Val	Arg	Gly	Ala	Tyr	Val	Gly	Gln	Leu	Tyr	Pro	Gly	Arg	
	65				70				75							
ACC	GAG	GCA	GAC	GCG	GAT	CGG	CGT	CAG	GGC	CTG	GAG	CTG	CGG	TTT	GAT	527
Thr	Glu	Ala	Asp	Ala	Asp	Arg	Arg	Gln	Gly	Leu	Glu	Leu	Arg	Phe	Asp	
	80				85				90					95		
GAG	ACA	GGG	CAG	CTG	GTG	GTG	GAG	CGG	GCG	ACG	ACG	TGG	ACC	AGG	GAG	575
Glu	Thr	Gly	Gln	Leu	Val	Val	Glu	Arg	Ala	Thr	Thr	Trp	Thr	Arg	Glu	
			100						105				110			
CCG	ACA	CTG	GTG	CGG	CTG	CAC	TCG	GAG	TGT	TAC	ACG	GGC	GAG	ACG	GCG	623
Pro	Thr	Leu	Val	Arg	Leu	His	Ser	Glu	Cys	Tyr	Thr	Gly	Glu	Thr	Ala	
			115					120					125			
TGG	AGC	GCG	CGG	TGC	GAC	TGC	GGG	GAG	CAG	TTC	GAC	CAG	GCG	GGT	AAG	671
Trp	Ser	Ala	Arg	Cys	Asp	Cys	Gly	Glu	Gln	Phe	Asp	Gln	Ala	Gly	Lys	
		130					135					140				
CTG	ATG	GCT	GCG	GCG	ACA	GAG	GGC	GAG	GTG	GTT	GGC	GGT	GCG	GGG	CAC	719
Leu	Met	Ala	Ala	Ala	Thr	Glu	Gly	Glu	Val	Val	Gly	Gly	Ala	Gly	His	
	145				150						155					
GGC	GTG	ATC	GTG	TAC	CTG	CGG	CAG	GAG	GGC	CGC	GGC	ATC	GGG	CTA	GGC	767
Gly	Val	Ile	Val	Tyr	Leu	Arg	Gln	Glu	Gly	Arg	Gly	Ile	Gly	Leu	Gly	
	160				165				170				175			
GAG	AAG	CTG	AAG	GCG	TAC	AAC	CTG	CAG	GAC	CTG	GGC	GCG	GAC	ACG	GTG	815
Glu	Lys	Leu	Lys	Ala	Tyr	Asn	Leu	Gln	Asp	Leu	Gly	Ala	Asp	Thr	Val	
			180					185				190				
CAG	GCG	AAC	GAG	CTG	CTC	AAC	CAC	CCT	GCG	GAC	GCG	CGC	GAC	TTC	TCG	863
Gln	Ala	Asn	Glu	Leu	Leu	Asn	His	Pro	Ala	Asp	Ala	Arg	Asp	Phe	Ser	
			195					200				205				
TTG	GGG	CGC	GCA	ATC	CTA	CTG	GAC	CTC	GGT	ATC	GAG	GAC	ATC	CGG	TTG	911
Leu	Gly	Arg	Ala	Ile	Leu	Leu	Asp	Leu	Gly	Ile	Glu	Asp	Ile	Arg	Leu	
		210					215					220				
CTC	ACG	AAT	AAC	CCC	GAC	AAG	GTG	CAG	CAG	GTG	CAC	TGT	CCG	CCG	GCG	959
Leu	Thr	Asn	Asn	Pro	Asp	Lys	Val	Gln	Gln	Val	His	Cys	Pro	Pro	Ala	
	225					230				235						
CTA	CGC	TGC	ATC	GAG	CGG	GTG	CCC	ATG	GTG	CCG	CTT	TCA	TGG	ACT	CAG	1007
Leu	Arg	Cys	Ile	Glu	Arg	Val	Pro	Met	Val	Pro	Leu	Ser	Trp	Thr	Gln	
	240				245					250					255	

16

CCC ACA CAG GGC GTG CGC TCG CGC GAG CTG GAC GGC TAC CTG CGC GCC	1055
Pro Thr Gln Gly Val Arg Ser Arg Glu Leu Asp Gly Tyr Leu Arg Ala	
260 265 270	
AAG GTC GAG CGC ATG GGG CAC ATG CTG CAG CGG CCG CTG GTG CTG CAC	1103
Lys Val Glu Arg Met Gly His Met Leu Gln Arg Pro Leu Val Leu His	
275 280 285	
ACG TCT GCG GCG GCC GAG CTC CCC CGC GCC AAC ACA CAC ATA TAATCTTTGC	1155
Thr Ser Ala Ala Ala Glu Leu Pro Arg Ala Asn Thr His Ile	
290 295 300	
TATATTAAAA CTCTATAAAC GTATGCCACA CGGCGCCCGC GGGCTGCCAC ACGTGCTCA	1215
CGGGCTGCCG AACAGTTCTA ACAAGTAATC GCGCGCCTCG CCAGTGATCG TGGCGAGCAC	1275
CTTGTCGTCC ATCATCACAT ATCCTCGGCT ACAGTCGTCG TTGAAGAGCG TGCA	1329

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 2:

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 301 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2:

Met Thr Glu Tyr Thr Val Pro Glu Val Arg Cys Val Ala Arg Ala Arg	
1 5 10 15	
Ile Pro Thr Val Gln Gly Thr Asp Val Phe Leu His Leu Tyr His Asn	
20 25 30	
Ser Ile Asp Ser Lys Glu His Leu Ala Ile Val Phe Gly Glu Asn Ile	
35 40 45	
Arg Ser Arg Ser Leu Phe Arg Tyr Arg Lys Asp Asp Thr Gln Gln Ala	
50 55 60	
Arg Met Val Arg Gly Ala Tyr Val Gly Gln Leu Tyr Pro Gly Arg Thr	
65 70 75 80	
Glu Ala Asp Ala Asp Arg Arg Gln Gly Leu Glu Leu Arg Phe Asp Glu	
85 90 95	
Thr Gly Gln Leu Val Val Glu Arg Ala Thr Thr Trp Thr Arg Glu Pro	
100 105 110	
Thr Leu Val Arg Leu His Ser Glu Cys Tyr Thr Gly Glu Thr Ala Trp	
115 120 125	
Ser Ala Arg Cys Asp Cys Gly Glu Gln Phe Asp Gln Ala Gly Lys Leu	
130 135 140	
Met Ala Ala Ala Thr Glu Gly Glu Val Val Gly Gly Ala Gly His Gly	
145 150 155 160	
Val Ile Val Tyr Leu Arg Gln Glu Gly Arg Gly Ile Gly Leu Gly Glu	
165 170 175	
Lys Leu Lys Ala Tyr Asn Leu Gln Asp Leu Gly Ala Asp Thr Val Gln	
180 185 190	
Ala Asn Glu Leu Leu Asn His Pro Ala Asp Ala Arg Asp Phe Ser Leu	
195 200 205	
Gly Arg Ala Ile Leu Leu Asp Leu Gly Ile Glu Asp Ile Arg Leu Leu	
210 215 220	

17

Thr Asn Asn Pro Asp Lys Val Gln Gln Val His Cys Pro Pro Ala Leu  
 225 230 235 240  
 Arg Cys Ile Glu Arg Val Pro Met Val Pro Leu Ser Trp Thr Gln Pro  
 245 250 255  
 Thr Gln Gly Val Arg Ser Arg Glu Leu Asp Gly Tyr Leu Arg Ala Lys  
 260 265 270  
 Val Glu Arg Met Gly His Met Leu Gln Arg Pro Leu Val Leu His Thr  
 275 280 285  
 Ser Ala Ala Ala Glu Leu Pro Arg Ala Asn Thr His Ile  
 290 295 300

## (2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 3:

## (i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 2627 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Doppel
- (D) TOPOLOGIE: linear

## (ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNS zu mRNS

## (iii) HYPOTHETISCH: NEIN

## (iii) ANTISENSE: NEIN

## (vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

- (A) ORGANISMUS: Ashbya gossypii

## (ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: 5'UTR
- (B) LÄNGE: 1..450

## (ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
- (B) LÄNGE: 451..2280

## (ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: 3'UTR
- (B) LÄNGE: 2281..2627

## (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 3:

CTGCAGGACA ATTTAAATTA CGATTACACG CGGCAGCCTT CTTGGTGCGA CAGGATTTTG 60  
 TACAAGAATG ACCCCAAGCG GGTAAGAGTT CATAGGTATG CCTCGATTGA TAGACGTTCC 120  
 ATTTTGAATT ATACTGATCA CGAACCCGTA ACGCTCGATG TCAGCGTTTC ATGCCATACA 180  
 CAATTTGTCC CAATGGCTAT GCAGAATATT TCCCCACAGA GCACCATGGA AATGTATGTG 240  
 GGAGACGTCA CAGATATACT ACTGATGTTG TTCTCCAGAG TATACTACGC CCCTACCATA 300  
 TTCGATCTTG TGGTATTGAC GATATTCCTC TGTTTGGTTT TACTGGCACT ATTCCGTTTG 360  
 ACGGTATAGC GCTATTCGTT CATAGTGACA CATGCGGCAC TAGCTATTCA GCGAATCCTT 420  
 TATAAACTGC TACTTAACGT TCGTAACACC ATG CTC AAA GGC GTT CCT GGC CTT 474  
 Met Leu Lys Gly Val Pro Gly Leu  
 1 5  
 CTT TTT AAG GAG ACG CAA CGT CAT CTG AAA CCC AGG CTG GTT AGG ATT 522  
 Leu Phe Lys Glu Thr Gln Arg His Leu Lys Pro Arg Leu Val Arg Ile  
 10 15 20  
 ATG GAA AAC ACA TCG CAG GAT GAG AGT CGC AAA AGA CAG GTC GCT TCG 570  
 Met Glu Asn Thr Ser Gln Asp Glu Ser Arg Lys Arg Gln Val Ala Ser  
 25 30 35 40

AAC TTG AGC AGC GAT GCC GAT GAG GGC TCG CCG GCA GTT ACG AGG CCG	618
Asn Leu Ser Ser Asp Ala Asp Glu Gly Ser Pro Ala Val Thr Arg Pro	
45 50 55	
GTT AAA ATC ACC AAA CGC CTC AGG AAG AAG AAC CTC GGG ACA GGC GAG	666
Val Lys Ile Thr Lys Arg Leu Arg Lys Lys Asn Leu Gly Thr Gly Glu	
60 65 70	
CTA CGG GAC AAA GCA GGA TTC AAG TTG AAG GTG CAA GAC GTG AGC AAA	714
Leu Arg Asp Lys Ala Gly Phe Lys Leu Lys Val Gln Asp Val Ser Lys	
75 80 85	
AAC CGT CAC AGA CAG GTC GAT CCG GAA TAC GAA GTC GTG GTA GAT GGC	762
Asn Arg His Arg Gln Val Asp Pro Glu Tyr Glu Val Val Val Asp Gly	
90 95 100	
CCG ATG CGC AAG ATC AAA CCG TAT TTC TTC ACA TAC AAG ACT TTC TGC	810
Pro Met Arg Lys Ile Lys Pro Tyr Phe Phe Thr Tyr Lys Thr Phe Cys	
105 110 115 120	
AAG GAG CGC TGG AGA GAT CGG AAG TTG CTT GAT GTG TTT GTG GAT GAA	858
Lys Glu Arg Trp Arg Asp Arg Lys Leu Leu Asp Val Phe Val Asp Glu	
125 130 135	
TTT CGG GAC CGC GAT AGG CCT TAC TAC GAG AAA GTC ATC GGT TCG GGT	906
Phe Arg Asp Arg Asp Arg Pro Tyr Tyr Glu Lys Val Ile Gly Ser Gly	
140 145 150	
GGT GTG CTC CTG AAC GGT AAG TCA TCG ACG TTA GAT AGC GTA TTG CGT	954
Gly Val Leu Leu Asn Gly Lys Ser Ser Thr Leu Asp Ser Val Leu Arg	
155 160 165	
AAT GGA GAC CTC ATT TCG CAC GAG CTG CAC CGT CAT GAG CCA CCG GTC	1002
Asn Gly Asp Leu Ile Ser His Glu Leu His Arg His Glu Pro Pro Val	
170 175 180	
TCC TCT AGG CCG ATT AGG ACG GTG TAC GAA GAT GAT GAC ATC CTG GTG	1050
Ser Ser Arg Pro Ile Arg Thr Val Tyr Glu Asp Asp Asp Ile Leu Val	
185 190 195 200	
ATT GAC AAG CCC AGC GGG ATT CCA GCC CAT CCC ACC GGG CGT TAC CGC	1098
Ile Asp Lys Pro Ser Gly Ile Pro Ala His Pro Thr Gly Arg Tyr Arg	
205 210 215	
TTC AAC TCC ATT ACG AAA ATA CTT GAA AAA CAG CTT GGA TAC ACT GTT	1146
Phe Asn Ser Ile Thr Lys Ile Leu Glu Lys Gln Leu Gly Tyr Thr Val	
220 225 230	
CAT CCA TGT AAC CGA CTG GAC CGC CTA ACC AGT GGC CTA ATG TTC TTG	1194
His Pro Cys Asn Arg Leu Asp Arg Leu Thr Ser Gly Leu Met Phe Leu	
235 240 245	
GCA AAA ACT CCA AAG GGA GCC GAT GAG ATG GGT GAT CAG ATG AAG GCG	1242
Ala Lys Thr Pro Lys Gly Ala Asp Glu Met Gly Asp Gln Met Lys Ala	
250 255 260	
CGC GAA GTG AAG AAA GAA TAT GTT GCC CGG GTT GTT GGG GAA TTT CCT	1290
Arg Glu Val Lys Lys Glu Tyr Val Ala Arg Val Val Gly Glu Phe Pro	
265 270 275 280	

ATA GGT GAG ATA GTT GTG GAT ATG CCA CTG AAG ACT ATA GAG CCG AAG	1338
Ile Gly Glu Ile Val Val Asp Met Pro Leu Lys Thr Ile Glu Pro Lys	
285 290 295	
CTT GCC CTA AAC ATG GTT TGC GAC CCG GAA GAC GAA GCG GGC AAG GGC	1386
Leu Ala Leu Asn Met Val Cys Asp Pro Glu Asp Glu Ala Gly Lys Gly	
300 305 310	
GCT AAG ACG CAG TTC AAA AGA ATC AGC TAC GAT GGA CAA ACG AGC ATA	1434
Ala Lys Thr Gln Phe Lys Arg Ile Ser Tyr Asp Gly Gln Thr Ser Ile	
315 320 325	
GTC AAG TGC CAA CCG TAC ACG GGC CGG ACG CAT CAG ATC CGT GTT CAC	1482
Val Lys Cys Gln Pro Tyr Thr Gly Arg Thr His Gln Ile Arg Val His	
330 335 340	
TTG CAA TAC CTG GGC TTC CCA ATT GCC AAC GAT CCG ATT TAT TCC AAT	1530
Leu Gln Tyr Leu Gly Phe Pro Ile Ala Asn Asp Pro Ile Tyr Ser Asn	
345 350 355 360	
CCG CAC ATA TGG GGC CCA AGT CTG GGC AAG GAA TGC AAA GCA GAC TAC	1578
Pro His Ile Trp Gly Pro Ser Leu Gly Lys Glu Cys Lys Ala Asp Tyr	
365 370 375	
AAG GAG GTC ATC CAA AAA CTA AAC GAA ATT GGT AAG ACT AAA TCT GCG	1626
Lys Glu Val Ile Gln Lys Leu Asn Glu Ile Gly Lys Thr Lys Ser Ala	
380 385 390	
GAA AGT TGG TAC CAT TCT GAT TCC CAA GGT GAA GTT TTC AAA GGG GAA	1674
Glu Ser Trp Tyr His Ser Asp Ser Gln Gly Glu Val Phe Lys Gly Glu	
395 400 405	
CAA TGC GAT GAA TGT GGC ACC GAA CTG TAC ACT GAC CCG GGC CCG AAT	1722
Gln Cys Asp Glu Cys Gly Thr Glu Leu Tyr Thr Asp Pro Gly Pro Asn	
410 415 420	
GAT CTT GAC TTA TGG TTG CAT GCA TAT CGG TAT GAA TCC ACT GAA CTG	1770
Asp Leu Asp Leu Trp Leu His Ala Tyr Arg Tyr Glu Ser Thr Glu Leu	
425 430 435 440	
GAT GAG AAC GGT GCT AAA AAG CGG AGT TAC TCT ACT GCG TTT CCT GAG	1818
Asp Glu Asn Gly Ala Lys Lys Arg Ser Tyr Ser Thr Ala Phe Pro Glu	
445 450 455	
TGG GCT CTT GAG CAG CAC GGC GAC TTC ATG CGG CTT GCC ATC GAA CAG	1866
Trp Ala Leu Glu Gln His Gly Asp Phe Met Arg Leu Ala Ile Glu Gln	
460 465 470	
GCT AAG AAA TGC CCA CCC GCG AAG ACA TCA TTT AGC GTT GGT GCC GTG	1914
Ala Lys Lys Cys Pro Pro Ala Lys Thr Ser Phe Ser Val Gly Ala Val	
475 480 485	
TTA GTT AAT GGG ACC GAG ATT TTG GCC ACT GGT TAC TCA CGG GAG CTG	1962
Leu Val Asn Gly Thr Glu Ile Leu Ala Thr Gly Tyr Ser Arg Glu Leu	
490 495 500	
GAA GGC AAC ACG CAC GCT GAA CAA TGT GCA CTT CAA AAA TAT TTT GAA	2010
Glu Gly Asn Thr His Ala Glu Gln Cys Ala Leu Gln Lys Tyr Phe Glu	
505 510 515 520	

CAA CAT AAA ACC GAC AAG GTT CCT ATT GGT ACA GTA ATA TAC ACG ACT	2058
Gln His Lys Thr Asp Lys Val Pro Ile Gly Thr Val Ile Tyr Thr Thr	
525 530 535	
ATG GAG CCT TGT TCT CTC CGT CTC AGT GGT AAT AAA CCG TGT GTT GAG	2106
Met Glu Pro Cys Ser Leu Arg Leu Ser Gly Asn Lys Pro Cys Val Glu	
540 545 550	
CGT ATA ATC TGC CAG CAG GGT AAT ATT ACT GCT GTT TTT GTT GGC GTA	2154
Arg Ile Ile Cys Gln Gln Gly Asn Ile Thr Ala Val Phe Val Gly Val	
555 560 565	
CTT GAG CCA GAC AAC TTC GTG AAG AAC AAT ACA AGT CGT GCG CTA TTG	2202
Leu Glu Pro Asp Asn Phe Val Lys Asn Asn Thr Ser Arg Ala Leu Leu	
570 575 580	
GAA CAA CAT GGT ATA GAC TAT ATT CTT GTC CCT GGG TTT CAA GAA GAA	2250
Glu Gln His Gly Ile Asp Tyr Ile Leu Val Pro Gly Phe Gln Glu Glu	
585 590 595 600	
TGT ACT GAA GCC GCA TTG AAG GGT CAT TGATTTTGCT GCGAATTGTA	2297
Cys Thr Glu Ala Ala Leu Lys Gly His	
605 610	
GATGACTTAA AATATCGAGG CGTATAATTC GTCGCATTTT ATATAGTTAT CTATGTTTAC	2357
ATGACTGTTT AAGCTTGATC TATATTTCTC AAGTGAATTG CCACATATGT TGGTACGGTA	2417
ATAAATTAAT GAGGGAGTTT TGAAATTCGC AACCAATCTT ATATACGTTT GATGATATAA	2477
ACGGATTGAG ATTCATTAAG CTACCTGATT TTCGCTGAAC TGTTTGTTAT AGGTTTTTAC	2537
AGTAAGATAG TTCCTAAGTT TGTTTATTGT CCCCAGTCGG CCAATTGTTC CGGACTTATT	2597
ATTATTACCA TTAGTGGTGT TAGTAGTATT	2627

## (2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 4:

## (i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 609 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

## (ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

## (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 4:

Met Leu Lys Gly Val Pro Gly Leu Leu Phe Lys Glu Thr Gln Arg His	
1 5 10 15	
Leu Lys Pro Arg Leu Val Arg Ile Met Glu Asn Thr Ser Gln Asp Glu	
20 25 30	
Ser Arg Lys Arg Gln Val Ala Ser Asn Leu Ser Ser Asp Ala Asp Glu	
35 40 45	
Gly Ser Pro Ala Val Thr Arg Pro Val Lys Ile Thr Lys Arg Leu Arg	
50 55 60	
Lys Lys Asn Leu Gly Thr Gly Glu Leu Arg Asp Lys Ala Gly Phe Lys	
65 70 75 80	
Leu Lys Val Gln Asp Val Ser Lys Asn Arg His Arg Gln Val Asp Pro	
85 90 95	
Glu Tyr Glu Val Val Val Asp Gly Pro Met Arg Lys Ile Lys Pro Tyr	
100 105 110	
Phe Phe Thr Tyr Lys Thr Phe Cys Lys Glu Arg Trp Arg Asp Arg Lys	
115 120 125	

Leu Leu Asp Val Phe Val Asp Glu Phe Arg Asp Arg Asp Arg Pro Tyr  
 130 135 140  
 Tyr Glu Lys Val Ile Gly Ser Gly Gly Val Leu Leu Asn Gly Lys Ser  
 145 150 155 160  
 Ser Thr Leu Asp Ser Val Leu Arg Asn Gly Asp Leu Ile Ser His Glu  
 165 170 175  
 Leu His Arg His Glu Pro Pro Val Ser Ser Arg Pro Ile Arg Thr Val  
 180 185 190  
 Tyr Glu Asp Asp Asp Ile Leu Val Ile Asp Lys Pro Ser Gly Ile Pro  
 195 200 205  
 Ala His Pro Thr Gly Arg Tyr Arg Phe Asn Ser Ile Thr Lys Ile Leu  
 210 215 220  
 Glu Lys Gln Leu Gly Tyr Thr Val His Pro Cys Asn Arg Leu Asp Arg  
 225 230 235 240  
 Leu Thr Ser Gly Leu Met Phe Leu Ala Lys Thr Pro Lys Gly Ala Asp  
 245 250 255  
 Glu Met Gly Asp Gln Met Lys Ala Arg Glu Val Lys Lys Glu Tyr Val  
 260 265 270  
 Ala Arg Val Val Gly Glu Phe Pro Ile Gly Glu Ile Val Val Asp Met  
 275 280 285  
 Pro Leu Lys Thr Ile Glu Pro Lys Leu Ala Leu Asn Met Val Cys Asp  
 290 295 300  
 Pro Glu Asp Glu Ala Gly Lys Gly Ala Lys Thr Gln Phe Lys Arg Ile  
 305 310 315 320  
 Ser Tyr Asp Gly Gln Thr Ser Ile Val Lys Cys Gln Pro Tyr Thr Gly  
 325 330 335  
 Arg Thr His Gln Ile Arg Val His Leu Gln Tyr Leu Gly Phe Pro Ile  
 340 345 350  
 Ala Asn Asp Pro Ile Tyr Ser Asn Pro His Ile Trp Gly Pro Ser Leu  
 355 360 365  
 Gly Lys Glu Cys Lys Ala Asp Tyr Lys Glu Val Ile Gln Lys Leu Asn  
 370 375 380  
 Glu Ile Gly Lys Thr Lys Ser Ala Glu Ser Trp Tyr His Ser Asp Ser  
 385 390 395 400  
 Gln Gly Glu Val Phe Lys Gly Glu Gln Cys Asp Glu Cys Gly Thr Glu  
 405 410 415  
 Leu Tyr Thr Asp Pro Gly Pro Asn Asp Leu Asp Leu Trp Leu His Ala  
 420 425 430  
 Tyr Arg Tyr Glu Ser Thr Glu Leu Asp Glu Asn Gly Ala Lys Lys Arg  
 435 440 445  
 Ser Tyr Ser Thr Ala Phe Pro Glu Trp Ala Leu Glu Gln His Gly Asp  
 450 455 460  
 Phe Met Arg Leu Ala Ile Glu Gln Ala Lys Lys Cys Pro Pro Ala Lys  
 465 470 475 480  
 Thr Ser Phe Ser Val Gly Ala Val Leu Val Asn Gly Thr Glu Ile Leu  
 485 490 495

## 22

Ala Thr Gly Tyr Ser Arg Glu Leu Glu Gly Asn Thr His Ala Glu Gln  
 500 505 510  
 Cys Ala Leu Gln Lys Tyr Phe Glu Gln His Lys Thr Asp Lys Val Pro  
 515 520 525  
 Ile Gly Thr Val Ile Tyr Thr Thr Met Glu Pro Cys Ser Leu Arg Leu  
 530 535 540  
 Ser Gly Asn Lys Pro Cys Val Glu Arg Ile Ile Cys Gln Gln Gly Asn  
 545 550 555 560  
 Ile Thr Ala Val Phe Val Gly Val Leu Glu Pro Asp Asn Phe Val Lys  
 565 570 575  
 Asn Asn Thr Ser Arg Ala Leu Leu Glu Gln His Gly Ile Asp Tyr Ile  
 580 585 590  
 Leu Val Pro Gly Phe Gln Glu Glu Cys Thr Glu Ala Ala Leu Lys Gly  
 595 600 605  
 His

## (2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 5:

## (i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 1082 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Doppel
- (D) TOPOLOGIE: linear

## (ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNS zu mRNS

## (iii) HYPOTHETISCH: NEIN

## (iii) ANTISENSE: NEIN

## (vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

- (A) ORGANISMUS: *Ashbya gossypii*

## (ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: 5'UTR
- (B) LAGE: 1..314

## (ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
- (B) LAGE: 315..953

## (ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: 3'UTR
- (B) LAGE: 954..1082

## (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 5:

CCCTTCTTGC ACGGTCGTTT CTGAACTCT ACGATTATTG GAACAATGAG TAAGTCCTCA	60
AATGTACCAC CTATCTGTAG TTTACTATCG GATTACTGG CTAAGAGCTG ACCTGTTAGG	120
CAAGTGAAAC ATATCACATC GCCAGCAGGT TGGGCTACCA AGGATAGTTG ATGACTTCCA	180
TCACCTATAA AAGCGGCTTG AGTGCTTTTG CAATGATTCT GTTCACATGA TGGACAAGAA	240
ATACGTACAA AAATTTCAAC GTTTTACAAG TTCCCAAGCT TAGTCAACTC ATCACCAACG	300
ACAAACCAAG CAAC ATG ACA AGC CCA TGC ACT GAT ATC GGT ACC GCT ATA	350

Met Thr Ser Pro Cys Thr Asp Ile Gly Thr Ala Ile



GAG CAG TTC AAG CAA AAT AAG ATG ATC ATC GTC ATG GAC CAC ATC TCG	398
Glu Gln Phe Lys Gln Asn Lys Met Ile Ile Val Met Asp His Ile Ser	
15 20 25	
AGA GAA AAC GAG GCC GAT CTA ATA TGT GCA GCA GCG CAC ATG ACT GCC	446
Arg Glu Asn Glu Ala Asp Leu Ile Cys Ala Ala Ala His Met Thr Ala	
30 35 40	
GAG CAA ATG GCA TTT ATG ATT CGG TAT TCC TCG GGC TAC GTT TGC GCT	494
Glu Gln Met Ala Phe Met Ile Arg Tyr Ser Ser Gly Tyr Val Cys Ala	
45 50 55 60	
CCA ATG ACC AAT GCG ATT GCC GAT AAG CTA GAC CTA CCG CTC ATG AAC	542
Pro Met Thr Asn Ala Ile Ala Asp Lys Leu Asp Leu Pro Leu Met Asn	
65 70 75	
ACA TTG AAA TGC AAG GCT TTC TCC GAT GAC AGA CAC AGC ACT GCG TAT	590
Thr Leu Lys Cys Lys Ala Phe Ser Asp Asp Arg His Ser Thr Ala Tyr	
80 85 90	
ACA ATC ACC TGT GAC TAT GCG CAC GGG ACG ACG ACA GGT ATC TCC GCA	638
Thr Ile Thr Cys Asp Tyr Ala His Gly Thr Thr Thr Gly Ile Ser Ala	
95 100 105	
CGT GAC CGG GCG TTG ACC GTG AAT CAG TTG GCG AAC CCG GAG TCC AAG	686
Arg Asp Arg Ala Leu Thr Val Asn Gln Leu Ala Asn Pro Glu Ser Lys	
110 115 120	
GCT ACC GAC TTC ACG AAG CCA GGC CAC ATT GTG CCA TTG CGT GCC CGT	734
Ala Thr Asp Phe Thr Lys Pro Gly His Ile Val Pro Leu Arg Ala Arg	
125 130 135 140	
GAC GGC GGC GTG CTC GAG CGT GAC GGG CAC ACC GAA GCG GCG CTC GAC	782
Asp Gly Gly Val Leu Glu Arg Asp Gly His Thr Glu Ala Ala Leu Asp	
145 150 155	
TTG TGC AGA CTA GCG GGT GTG CCA GAG GTC GCT GCT ATT TGT GAA TTA	830
Leu Cys Arg Leu Ala Gly Val Pro Glu Val Ala Ala Ile Cys Glu Leu	
160 165 170	
GTA AGC GAA AGG GAC GTC GGG CTG ATG ATG ACT TTG GAT GAG TGT ATA	878
Val Ser Glu Arg Asp Val Gly Leu Met Met Thr Leu Asp Glu Cys Ile	
175 180 185	
GAA TTC AGC AAG AAG CAC GGT CTT GCC CTC ATC ACC GTG CAT GAC CTG	926
Glu Phe Ser Lys Lys His Gly Leu Ala Leu Ile Thr Val His Asp Leu	
190 195 200	
AAG GCT GCA GTT GCC GCC AAG CAG TAGACGGCAA CGAGTTCTTT AAGTCGGTGT	980
Lys Ala Ala Val Ala Ala Lys Gln	
205 210	
TCATTTATGT AATATAACCAT TTCATCGAAA AAGTCAAATG GTATGAACTA GATTTATCAA	1040
TAGTATCTAA GAGTTATGGT ATTCGCAAAA GCTTATCGAT AC	1082

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 6:

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 212 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 6:

Met Thr Ser Pro Cys Thr Asp Ile Gly Thr Ala Ile Glu Gln Phe Lys  
 1 5 10 15  
 Gln Asn Lys Met Ile Ile Val Met Asp His Ile Ser Arg Glu Asn Glu  
 20 25 30  
 Ala Asp Leu Ile Cys Ala Ala Ala His Met Thr Ala Glu Gln Met Ala  
 35 40 45  
 Phe Met Ile Arg Tyr Ser Ser Gly Tyr Val Cys Ala Pro Met Thr Asn  
 50 55 60  
 Ala Ile Ala Asp Lys Leu Asp Leu Pro Leu Met Asn Thr Leu Lys Cys  
 65 70 75 80  
 Lys Ala Phe Ser Asp Asp Arg His Ser Thr Ala Tyr Thr Ile Thr Cys  
 85 90 95  
 Asp Tyr Ala His Gly Thr Thr Thr Gly Ile Ser Ala Arg Asp Arg Ala  
 100 105 110  
 Leu Thr Val Asn Gln Leu Ala Asn Pro Glu Ser Lys Ala Thr Asp Phe  
 115 120 125  
 Thr Lys Pro Gly His Ile Val Pro Leu Arg Ala Arg Asp Gly Gly Val  
 130 135 140  
 Leu Glu Arg Asp Gly His Thr Glu Ala Ala Leu Asp Leu Cys Arg Leu  
 145 150 155 160  
 Ala Gly Val Pro Glu Val Ala Ala Ile Cys Glu Leu Val Ser Glu Arg  
 165 170 175  
 Asp Val Gly Leu Met Met Thr Leu Asp Glu Cys Ile Glu Phe Ser Lys  
 180 185 190  
 Lys His Gly Leu Ala Leu Ile Thr Val His Asp Leu Lys Ala Ala Val  
 195 200 205  
 Ala Ala Lys Gln  
 210

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 7:

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 996 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Doppel
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNS zu mRNS

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iii) ANTISENSE: NEIN

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: *Ashbya gossypii*

(ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: 5'UTR
- (B) LAGE: 1..270

(ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
- (B) LAGE: 271..789

## (ix) MERKMALE:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: 3'UTR

(B) LAGE: 790..996

## (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 7:

TGGTATAATG ATACAGGAAG TGAAAATCCG AAAGGTTTCAG ACGATGAAAA GAGTTTGAGA	60
CGCATCAATG ATCAGCTTTG AGCTATATGT AAGTCTATTA ATTGATTACT AATAGCAATT	120
TATGGTATCC TCTGTTCTGC ATATCGACGG TTCTCACGTG ATGATCAGCT TGAGGCTTCG	180
CGGATAAAGT TCCATCGATT ACTATAAAAC CATCACATTA AACGTTCACT ATAGGCATAC	240
ACACAGACTA AGTTCAAGTT AGCAGTGACA ATG ATT AAG GGA TTA GGC GAA GTT	294
Met Ile Lys Gly Leu Gly Glu Val	
1 5	
GAT CAA ACC TAC GAT GCG AGC TCT GTC GAG GTT GGC ATT GTC CAC GCG	342
Asp Gln Thr Tyr Asp Ala Ser Ser Val Glu Val Gly Ile Val His Ala	
10 15 20	
AGA TGG AAC AAG ACT GTC ATT GAC GCT CTC GAC CAA GGT GCA ATT GAG	390
Arg Trp Asn Lys Thr Val Ile Asp Ala Leu Asp Gln Gly Ala Ile Glu	
25 30 35 40	
AAA CTG CTT GCT ATG GGA GTG AAG GAG AAG AAT ATC ACT GTA AGC ACC	438
Lys Leu Leu Ala Met Gly Val Lys Glu Lys Asn Ile Thr Val Ser Thr	
45 50 55	
GTT CCA GGT GCG TTT GAA CTA CCA TTT GGC ACT CAG CGG TTT GCC GAG	486
Val Pro Gly Ala Phe Glu Leu Pro Phe Gly Thr Gln Arg Phe Ala Glu	
60 65 70	
CTG ACC AAG GCA AGT GGC AAG CAT TTG GAC GTG GTC ATC CCA ATT GGA	534
Leu Thr Lys Ala Ser Gly Lys His Leu Asp Val Val Ile Pro Ile Gly	
75 80 85	
GTC CTG ATC AAA GGC GAC TCA ATG CAC TTT GAA TAT ATA TCA GAC TCT	582
Val Leu Ile Lys Gly Asp Ser Met His Phe Glu Tyr Ile Ser Asp Ser	
90 95 100	
GTG ACT CAT GCC TTA ATG AAC CTA CAG AAG AAG ATT CGT CTT CCT GTC	630
Val Thr His Ala Leu Met Asn Leu Gln Lys Lys Ile Arg Leu Pro Val	
105 110 115 120	
ATT TTT GGT TTG CTA ACG TGT CTA ACA GAG GAA CAA GCG TTG ACA CGT	678
Ile Phe Gly Leu Leu Thr Cys Leu Thr Glu Glu Gln Ala Leu Thr Arg	
125 130 135	
GCA GGC CTC GGT GAA TCT GAA GGC AAG CAC AAC CAC GGT GAA GAC TGG	726
Ala Gly Leu Gly Glu Ser Glu Gly Lys His Asn His Gly Glu Asp Trp	
140 145 150	
GGT GCT GCT GCC GTG GAG ATG GCT GTA AAG TTT GGC CCA CGC GCC GAA	774
Gly Ala Ala Val Glu Met Ala Val Lys Phe Gly Pro Arg Ala Glu	
155 160 165	
CAA ATG AAG AAG TGAATATTAA AAAATCACTA CTTAAAATTA ACGTTTTTAT	826
Gln Met Lys Lys	
170	
TATGTCTATA TCAAATTCTT ACGTGATAAC TTTTGATTTC GCTTCCTGGA TTGGCGCAAG	886
GCCTCCCTGT GTCGCAGTTT TTGTTACCG GTCCACACAG CTCTGTTTTT CCAGAACATA	946
TCCTCCCAGC CGGCGAACCG GTTAGACGCT TCTGCTGGCG TTCTTATTTT	996

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 8:

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 172 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 8:

Met	Ile	Lys	Gly	Leu	Gly	Glu	Val	Asp	Gln	Thr	Tyr	Asp	Ala	Ser	Ser
1				5					10					15	
Val	Glu	Val	Gly	Ile	Val	His	Ala	Arg	Trp	Asn	Lys	Thr	Val	Ile	Asp
			20					25					30		
Ala	Leu	Asp	Gln	Gly	Ala	Ile	Glu	Lys	Leu	Leu	Ala	Met	Gly	Val	Lys
		35					40					45			
Glu	Lys	Asn	Ile	Thr	Val	Ser	Thr	Val	Pro	Gly	Ala	Phe	Glu	Leu	Pro
	50					55				60					
Phe	Gly	Thr	Gln	Arg	Phe	Ala	Glu	Leu	Thr	Lys	Ala	Ser	Gly	Lys	His
65				70						75				80	
Leu	Asp	Val	Val	Ile	Pro	Ile	Gly	Val	Leu	Ile	Lys	Gly	Asp	Ser	Met
				85				90					95		
His	Phe	Glu	Tyr	Ile	Ser	Asp	Ser	Val	Thr	His	Ala	Leu	Met	Asn	Leu
			100					105				110			
Gln	Lys	Lys	Ile	Arg	Leu	Pro	Val	Ile	Phe	Gly	Leu	Leu	Thr	Cys	Leu
		115					120					125			
Thr	Glu	Glu	Gln	Ala	Leu	Thr	Arg	Ala	Gly	Leu	Gly	Glu	Ser	Glu	Gly
	130					135					140				
Lys	His	Asn	His	Gly	Glu	Asp	Trp	Gly	Ala	Ala	Ala	Val	Glu	Met	Ala
145				150						155				160	
Val	Lys	Phe	Gly	Pro	Arg	Ala	Glu	Gln	Met	Lys	Lys				
				165				170							

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 9:

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 1511 Basenpaare

(B) ART: Nukleinsäure

(C) STRANGFORM: Doppel

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNS zu mRNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iii) ANTISENSE: NEIN

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: *Ashbya gossypii*

(ix) MERKMALE:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: 5' UTR

(B) LAGE: 1..524

(ix) MERKMALE:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS

(B) LAGE: 525..1232

(ix) MERKMALE:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: 3'UTR

(B) LAGE: 1233...1511

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 9:

TGTATTCAAC CTGGAGGATA ACGAAATTC CATGGCGCGG GCGATACCAA CCCACAGGAG	60
CCAGATATAA GACCAATCCC GCGGGGTGTG CCAGCCGCCA TCAGAGACAG CGGGCCAGCA	120
AGGCATGTGA AGTCAAAGG CGCCAGCTCC TTATCCGCTC CCGCACAAGC AGGACCGGCA	180
TATCCCGATG AGCGCGCCAG CACCCAGACG CTACACCACC ATTCGAAGTA GACTTTAAAA	240
GAGCGCTTTC CAGCTTCTCA GGCAGTTAGC TCTACGACAA AGGAACCAAG TGATTTTCCC	300
GATAGACGCG ACTTGCTCAA CGATGTTTCT GTGACCAGCG CAAGGAGAGA TAGTCCTAAA	360
GTATAATCAG ATAGTTAGTC GTATCTTCTA GTTTTATTAG TCAGCTACAT GCGGAACCGC	420
CATTTCTTA TGCATGTCTT ACGAGTTTAA AAAGCTCGCG GTAGCAGAAA AGAAGATGCA	480
TAGATGGCAT ACCGAAGCCT ATATCGCCCA TAGAAGTTGA TAGG ATG TTT ACC GGT	536
Met Phe Thr Gly	
1	
ATA GTG GAA CAC ATT GGC ACT GTT GCT GAG TAC TTG GAG AAC GAT GCC	584
Ile Val Glu His Ile Gly Thr Val Ala Glu Tyr Leu Glu Asn Asp Ala	
5 10 15 20	
AGC GAG GCA GGC GGC AAC GGT GTG TCA GTC CTT ATC AAG GAT GCG GCT	632
Ser Glu Ala Gly Gly Asn Gly Val Ser Val Leu Ile Lys Asp Ala Ala	
25 30 35	
CCG ATA CTG GCG GAT TGC CAC ATC GGT GAC TCG ATT GCA TGC AAT GGT	680
Pro Ile Leu Ala Asp Cys His Ile Gly Asp Ser Ile Ala Cys Asn Gly	
40 45 50	
ATC TGC CTG ACG GTG ACG GAG TTC ACG GCC GAT AGC TTC AAG GTC GGG	728
Ile Cys Leu Thr Val Thr Glu Phe Thr Ala Asp Ser Phe Lys Val Gly	
55 60 65	
ATC GCA CCA GAA ACA GTT TAT CGG ACG GAA GTC AGC AGC TGG AAA GCT	776
Ile Ala Pro Glu Thr Val Tyr Arg Thr Glu Val Ser Ser Trp Lys Ala	
70 75 80	
GGC TCC AAG ATC AAC CTA GAA AGG GCC ATC TCG GAC GAC AGG CGC TAC	824
Gly Ser Lys Ile Asn Leu Glu Arg Ala Ile Ser Asp Asp Arg Arg Tyr	
85 90 95 100	
GGC GGG CAC TAC GTG CAG GGC CAC GTC GAC TCG GTG GCC TCT ATT GTA	872
Gly Gly His Tyr Val Gln Gly His Val Asp Ser Val Ala Ser Ile Val	
105 110 115	
TCC AGA GAG CAC GAC GGG AAC TCT ATC AAC TTT AAG TTT AAA CTG CGC	920
Ser Arg Glu His Asp Gly Asn Ser Ile Asn Phe Lys Phe Lys Leu Arg	
120 125 130	
GAT CAA GAG TAC GAG AAG TAC GTA GTA GAA AAG GGT TTT GTG GCG ATC	968
Asp Gln Glu Tyr Glu Lys Tyr Val Val Glu Lys Gly Phe Val Ala Ile	
135 140 145	
GAC GGT GTG TCG CTG ACT GTA AGC AAG ATG GAT CCA GAT GGC TGT TTC	1016
Asp Gly Val Ser Leu Thr Val Ser Lys Met Asp Pro Asp Gly Cys Phe	
150 155 160	

TAC ATC TCG ATG ATT GCA CAC ACG CAG ACC GCT GTA GCC CTT CCA CTG	1064
Tyr Ile Ser Met Ile Ala His Thr Gln Thr Ala Val Ala Leu Pro Leu	
165 170 175 180	
AAG CCG GAC GGT GCC CTC GTG AAC ATA GAA ACG GAT GTT AAC GGC AAG	1112
Lys Pro Asp Gly Ala Leu Val Asn Ile Glu Thr Asp Val Asn Gly Lys	
185 190 195	
CTA GTA GAG AAG CAG GTT GCA CAG TAC CTG AAT GCG CAG CTG GAA GGT	1160
Leu Val Glu Lys Gln Val Ala Gln Tyr Leu Asn Ala Gln Leu Glu Gly	
200 205 210	
GAG AGC TCG CCA TTG CAG CGC GTG CTC GAA AGG ATT ATT GAA TCC AAG	1208
Glu Ser Ser Pro Leu Gln Arg Val Leu Glu Arg Ile Ile Glu Ser Lys	
215 220 225	
CTT GCT AGC ATC TCA AAT AAG TGATTATATT ATCTTGGGTG CTGTATATCT	1259
Leu Ala Ser Ile Ser Asn Lys	
230 235	
TATGTATGTC TTACGACTGT GAATCAGAGG GGTGGCAGCT GGAACACCAG CGACACACCT	1319
TCGTCTCCCG CGGTGATCAG CCTTCTGTTT TCCTCAAGTA GTACAAAGTC TAGGACACCC	1379
TGTTGTGGCC AACGCAAACA TGGAGCTGCT GCCCGTTACG CACGTCGAAC TCGTAGACCT	1439
TGCCGTCAAT GCACGAGGCG AACAGGTGGA AACCGGTGGT CTTGTCAAAC CGCCAGCTTC	1499
GTGACCGAGT CC	1511

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 10:

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 235 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 10:

Met Phe Thr Gly Ile Val Glu His Ile Gly Thr Val Ala Glu Tyr Leu	
1 5 10 15	
Glu Asn Asp Ala Ser Glu Ala Gly Gly Asn Gly Val Ser Val Leu Ile	
20 25 30	
Lys Asp Ala Ala Pro Ile Leu Ala Asp Cys His Ile Gly Asp Ser Ile	
35 40 45	
Ala Cys Asn Gly Ile Cys Leu Thr Val Thr Glu Phe Thr Ala Asp Ser	
50 55 60	
Phe Lys Val Gly Ile Ala Pro Glu Thr Val Tyr Arg Thr Glu Val Ser	
65 70 75 80	
Ser Trp Lys Ala Gly Ser Lys Ile Asn Leu Glu Arg Ala Ile Ser Asp	
85 90 95	
Asp Arg Arg Tyr Gly Gly His Tyr Val Gln Gly His Val Asp Ser Val	
100 105 110	
Ala Ser Ile Val Ser Arg Glu His Asp Gly Asn Ser Ile Asn Phe Lys	
115 120 125	
Phe Lys Leu Arg Asp Gln Glu Tyr Glu Lys Tyr Val Val Glu Lys Gly	
130 135 140	
Phe Val Ala Ile Asp Gly Val Ser Leu Thr Val Ser Lys Met Asp Pro	
145 150 155 160	

## 29

Asp Gly Cys Phe Tyr Ile Ser Met Ile Ala His Thr Gln Thr Ala Val  
 165 170 175  
 Ala Leu Pro Leu Lys Pro Asp Gly Ala Leu Val Asn Ile Glu Thr Asp  
 180 185 190  
 Val Asn Gly Lys Leu Val Glu Lys Gln Val Ala Gln Tyr Leu Asn Ala  
 195 200 205  
 Gln Leu Glu Gly Glu Ser Ser Pro Leu Gln Arg Val Leu Glu Arg Ile  
 210 215 220  
 Ile Glu Ser Lys Leu Ala Ser Ile Ser Asn Lys  
 225 230 235

## (2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 11:

## (i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 1596 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Doppel
- (D) TOPOLOGIE: linear

## (ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNS zu mRNS

## (iii) HYPOTHETISCH: NEIN

## (iii) ANTISENSE: NEIN

## (vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

- (A) ORGANISMUS: Ashbya gossypii

## (ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: 5'UTR
- (B) LAGE: 1..352

## (ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
- (B) LAGE: 353..1093

## (ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: 3'UTR
- (B) LAGE: 1094..1596

## (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 11:

AGAAGAAGCG CAGGCGCCAG TCCGAGCTGG AGGAGAACGA GGCGGCGCGG TTGACGAACA	60
GCGCGCTGCC CATGGACGAT GCGGGTATAC AGACGGCGGG TATACAGACG GCGGGTGGTG	120
CCGAGAGAGG CACCAGGCCG GCTTCCTCCA GCGATGCAAG GAAGAGAAGG GGACCAGAGG	180
CGAAGTTCAA GCCATCTAAG GTACAGAAGC CCAATTGAA GCGAACTGCA TCGTCCCGGG	240
CGGATGAGAA CGAGTTCTCG ATATTATAGA GGCCCCCGTT TCGAGTGATT GCGGTCAAAA	300
ACGGCTATCT GCCTTCGTCC GCCCCACCA CCCTCGGGAA CACTGGCAAA CC ATG	355
Met	
1	
GCG CTA ATA CCA CTT TCT CAA GAT CTG GCT GAT ATA CTA GCA CCG TAC	403
Ala Leu Ile Pro Leu Ser Gln Asp Leu Ala Asp Ile Leu Ala Pro Tyr	
5 10 15	
TTA CCG ACA CCA CCG GAC TCA TCC GCA CGC CTG CCG TTT GTC ACG CTG	451
Leu Pro Thr Pro Pro Asp Ser Ser Ala Arg Leu Pro Phe Val Thr Leu	
20 25 30	

30

ACG TAT GCG CAG TCC CTA GAT GCT CGT ATC GCG AAG CAA AAG GGT GAA	499
Thr Tyr Ala Gln Ser Leu Asp Ala Arg Ile Ala Lys Gln Lys Gly Glu	
35 40 45	
AGG ACG GTT ATT TCG CAT GAG GAG ACC AAG ACA ATG ACG CAT TAT CTA	547
Arg Thr Val Ile Ser His Glu Glu Thr Lys Thr Met Thr His Tyr Leu	
50 55 60 65	
CGC TAC CAT CAT AGC GGC ATC CTG ATT GGC TCG GGC ACA GCC CTT GCG	595
Arg Tyr His His Ser Gly Ile Leu Ile Gly Ser Gly Thr Ala Leu Ala	
70 75 80	
GAC GAC CCG GAT CTC AAT TGC CGG TGG ACA CCT GCA GCG GAC GGG GCG	643
Asp Asp Pro Asp Leu Asn Cys Arg Trp Thr Pro Ala Ala Asp Gly Ala	
85 90 95	
GAT TGC ACC GAA CAG TCT TCA CCA CGA CCC ATT ATC TTG GAT GTT CGG	691
Asp Cys Thr Glu Gln Ser Ser Pro Arg Pro Ile Ile Leu Asp Val Arg	
100 105 110	
GGC AGA TGG AGA TAC CGC GGG TCC AAA ATA GAG TAT CTG CAT AAC CTT	739
Gly Arg Trp Arg Tyr Arg Gly Ser Lys Ile Glu Tyr Leu His Asn Leu	
115 120 125	
GGC AAG GGG AAG GCG CCC ATA GTG GTC ACG GGG GGT GAG CCG GAG GTC	787
Gly Lys Gly Lys Ala Pro Ile Val Val Thr Gly Gly Glu Pro Glu Val	
130 135 140 145	
CGC GAA CTA GGC GTC AGT TAC CTG CAG CTG GGT GTC GAC GAG GGT GGC	835
Arg Glu Leu Gly Val Ser Tyr Leu Gln Leu Gly Val Asp Glu Gly Gly	
150 155 160	
CGC TTG AAT TGG GGC GAG TTG TTT GAG CGA CTC TAT TCT GAG CAC CAC	883
Arg Leu Asn Trp Gly Glu Leu Phe Glu Arg Leu Tyr Ser Glu His His	
165 170 175	
CTG GAA AGT GTC ATG GTC GAA GGC GGC GCG GAG GTG CTC AAC CAG CTG	931
Leu Glu Ser Val Met Val Glu Gly Gly Ala Glu Val Leu Asn Gln Leu	
180 185 190	
CTG CTG CGC CCA GAT ATT GTG GAC AGT CTG GTG ATC ACG ATA GGA TCC	979
Leu Leu Arg Pro Asp Ile Val Asp Ser Leu Val Ile Thr Ile Gly Ser	
195 200 205	
AAG TTC CTG GGC TCA CTA GGT GTT GCG GTC TCA CCA GCT GAG GAG GTG	1027
Lys Phe Leu Gly Ser Leu Gly Val Ala Val Ser Pro Ala Glu Glu Val	
210 215 220 225	
AAC CTA GAG CAT GTG AAC TGG TGG CAC GGA ACA AGT GAC AGT GTT TTG	1075
Asn Leu Glu His Val Asn Trp Trp His Gly Thr Ser Asp Ser Val Leu	
230 235 240	
TGC GGC CGG CTC GCA TAGCGGTTAT GACTGGTCTA CTAGTTAAAA CTATTTACTC	1130
Cys Gly Arg Leu Ala	
245	
CTATACATAT TGCGTCACAT AGCGTTTATC CCCCTCGCCA ACCGCCTCGT GCCGTTGGAA	1190
ACACGGCGGC CGGGGGACCT CAAGCGCTCC GCATCGACTA GTTTAATTTA CAAACAGATT	1250
CTGTAAGTTG CGTAACGGCC AGAGGTCTCT GACTTTCTGA TAATCTTCAC CACCTCACCT	1310
CGCTTCAACC CCAGGTATAA TGCAACTTGG ATCCATCCTC TGGATTCTAG GTAAGTGA	1370
TTCCTTTAAC CTGTATCTCT TCAACAACCTC CTTCTTTTCT TCGTCGCTGA GTTTGATATG	1430



TTTTGGCACA	AGCTCATGGT	GCGTGATATT	TACCACCAAA	GCTGTTTCGT	TGAAAGTCTC	1490
AATTGTAGCA	GGAGCGACGG	AGGGAAGCAG	TTTCAACGCG	CTGGGCGTTA	TGCCGTTCTG	1550
ATATATGAAA	ATACCCGTCT	GGAAGTTCTT	CTCGCCAATG	TGGATC		1596

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 12:

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 246 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 12:

[illegible]

## Patentansprüche

1. DNA-Sequenzen, die für ein Polypeptid mit der in SEQ ID NO: 2  
5 dargestellten Aminosäuresequenz codieren oder für ein Analoges oder Derivat des Polypeptids gemäß SEQ ID NO: 2, worin eine oder mehrere Aminosäuren deletiert, hinzugefügt oder durch andere Aminosäuren substituiert worden sind, ohne die enzymatische Wirkung des Polypeptids wesentlich zu reduzieren.  
10
2. DNA-Sequenzen, die für ein Polypeptid mit der in SEQ ID NO: 4  
dargestellten Aminosäuresequenz codieren oder für ein Analoges oder Derivat des Polypeptids gemäß SEQ ID NO: 4, worin  
15 eine oder mehrere Aminosäuren deletiert, hinzugefügt oder durch andere Aminosäuren substituiert worden sind, ohne die enzymatische Wirkung des Polypeptids wesentlich zu reduzieren.
- 20 3. DNA-Sequenzen, die für ein Polypeptid mit der in SEQ ID NO: 6  
dargestellten Aminosäuresequenz codieren oder für ein Analoges oder Derivat des Polypeptids gemäß SEQ ID NO: 6, worin eine oder mehrere Aminosäuren deletiert, hinzugefügt oder durch andere Aminosäuren substituiert worden sind, ohne die  
25 enzymatische Wirkung des Polypeptids wesentlich zu reduzieren.
4. DNA-Sequenzen, die für ein Polypeptid mit der in SEQ ID NO: 8  
dargestellten Aminosäuresequenz codieren oder für ein Analoges oder Derivat des Polypeptids gemäß SEQ ID NO: 8, worin  
30 eine oder mehrere Aminosäuren deletiert, hinzugefügt oder durch andere Aminosäuren substituiert worden sind, ohne die enzymatische Wirkung des Polypeptids wesentlich zu reduzieren.
- 35 5. DNA-Sequenzen, die für ein Polypeptid mit der in SEQ ID NO: 10  
dargestellten Aminosäuresequenz codieren oder für ein Analoges oder Derivat des Polypeptids gemäß SEQ ID NO: 10, worin eine oder mehrere Aminosäuren deletiert, hinzugefügt oder  
40 durch andere Aminosäuren substituiert worden sind, ohne die enzymatische Wirkung des Polypeptids wesentlich zu reduzieren.

6. DNA-Sequenzen, die für ein Polypeptid mit der in SEQ ID NO: 12 dargestellten Aminosäuresequenz codieren oder für ein Analoges oder Derivat des Polypeptids gemäß SEQ ID NO: 12, worin eine oder mehrere Aminosäuren deletiert, hinzugefügt oder durch andere Aminosäuren substituiert worden sind, ohne die enzymatische Wirkung des Polypeptids wesentlich zu reduzieren.
7. Expressionsvektor, enthaltend eine oder mehrere DNA-Sequenzen gemäß Anspruch 1 bis 6.
8. Wirtsorganismus der mit einem Expressionssystem gemäß Anspruch 7 transformiert worden ist.
9. Rekombinantes Herstellverfahren für Riboflavin, dadurch gekennzeichnet, daß ein Wirtsorganismus gemäß Anspruch 8 verwendet wird.

20

25

30

35

40

45

Fig. 1

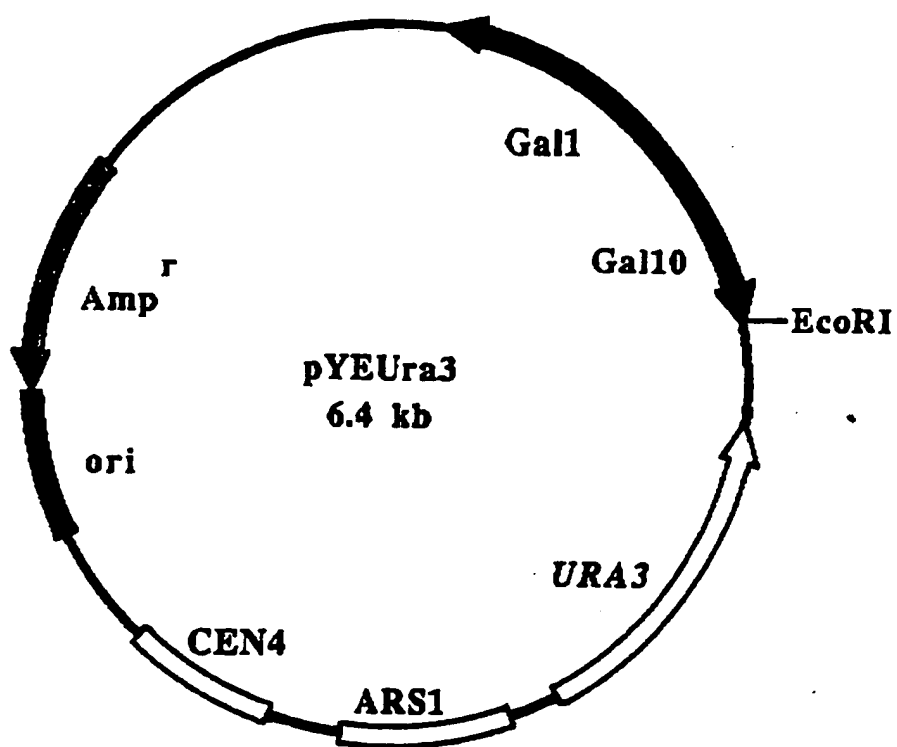


Fig. 2

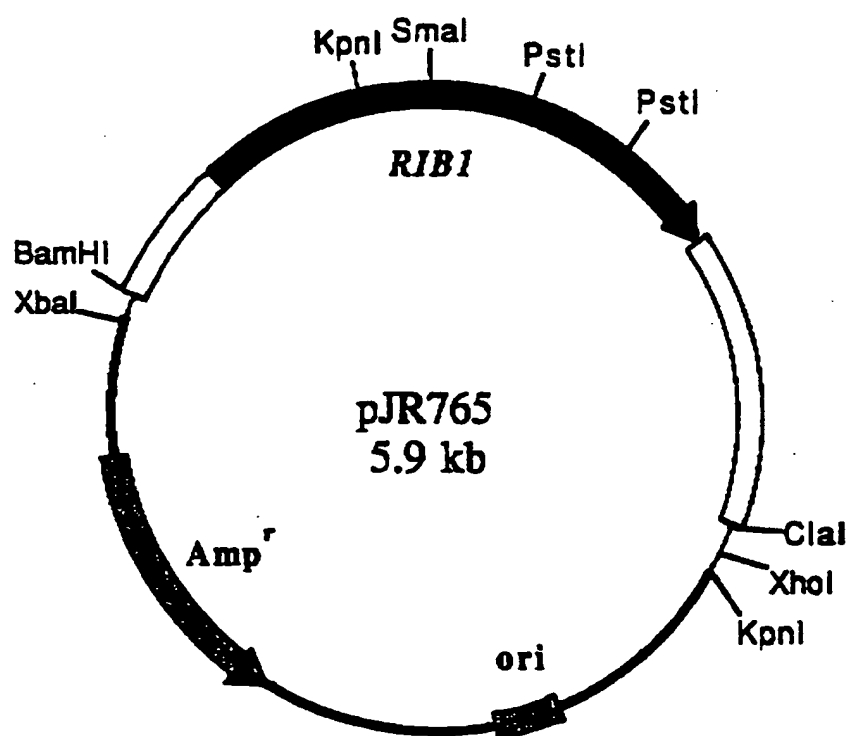


Fig. 3

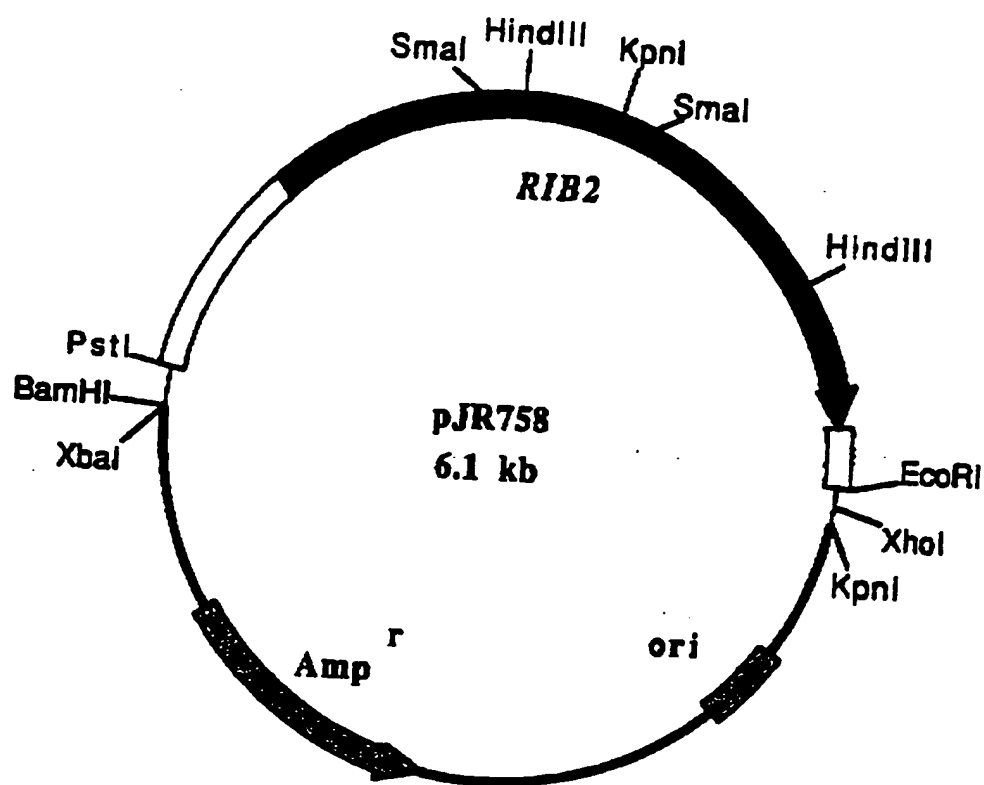


Fig. 4

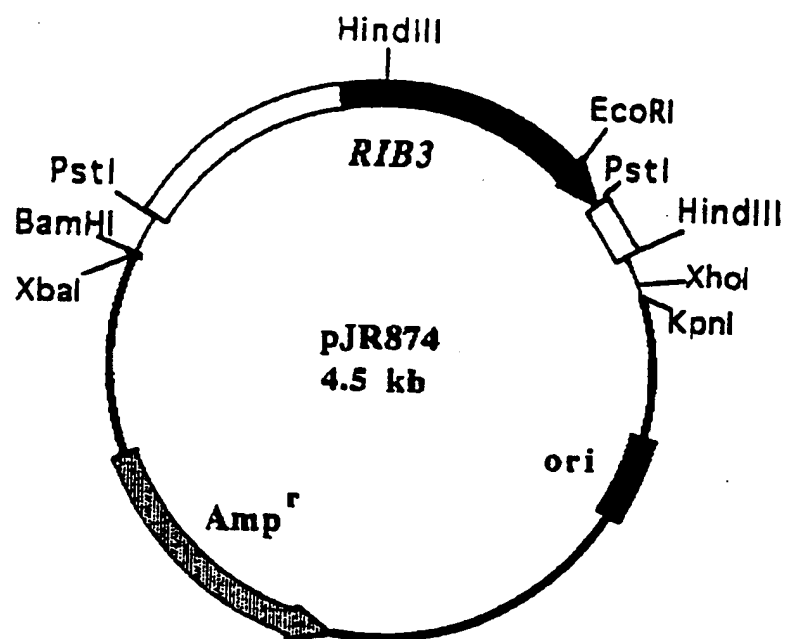


Fig. 5

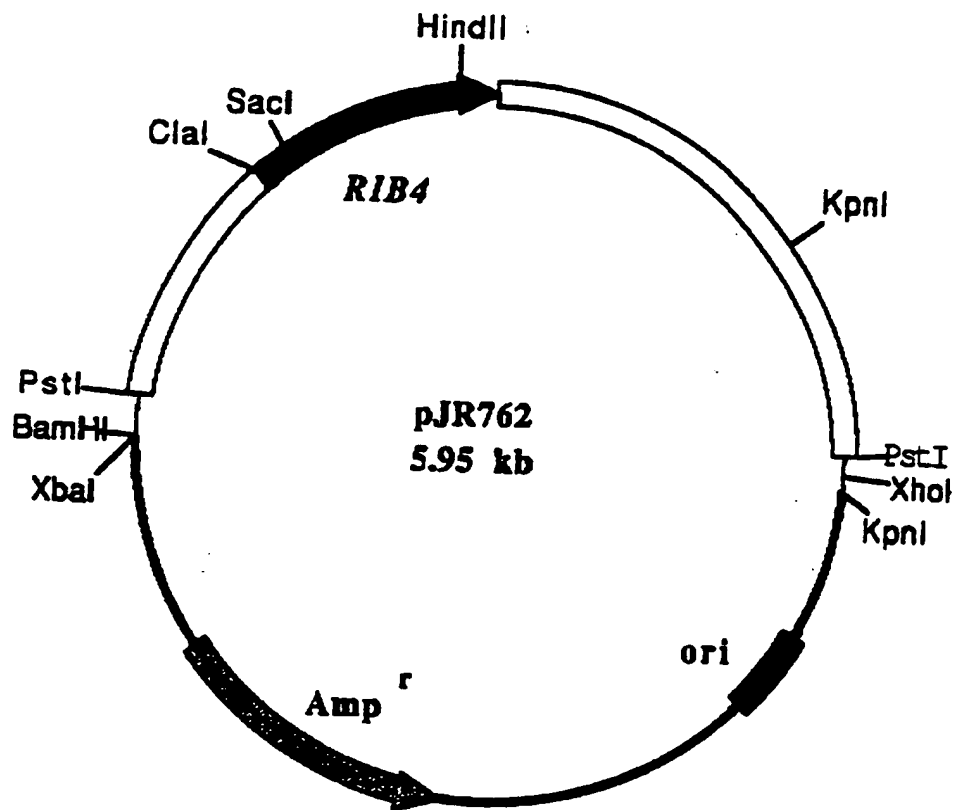




Fig. 6

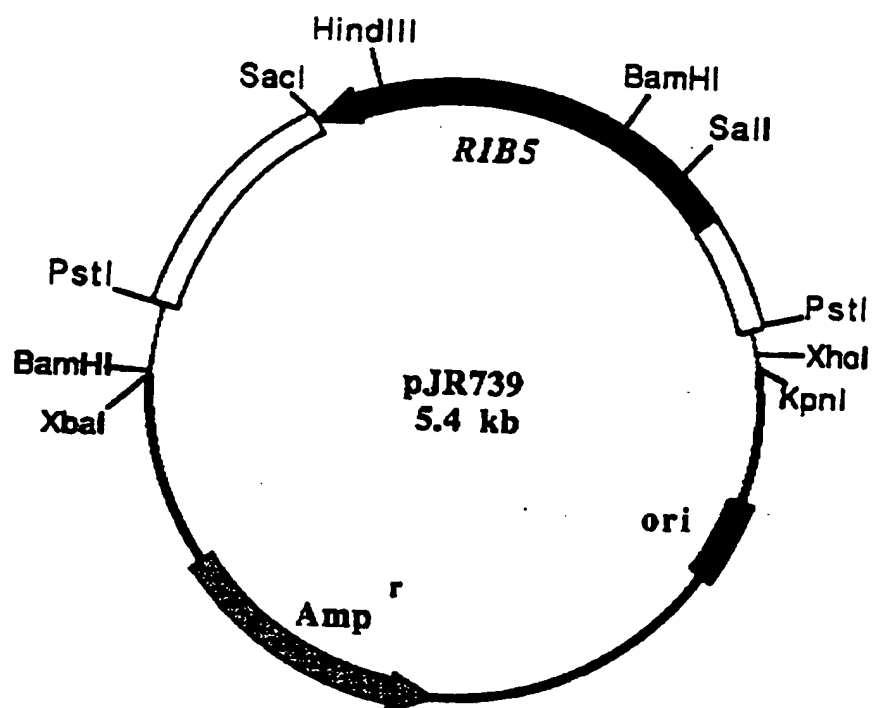
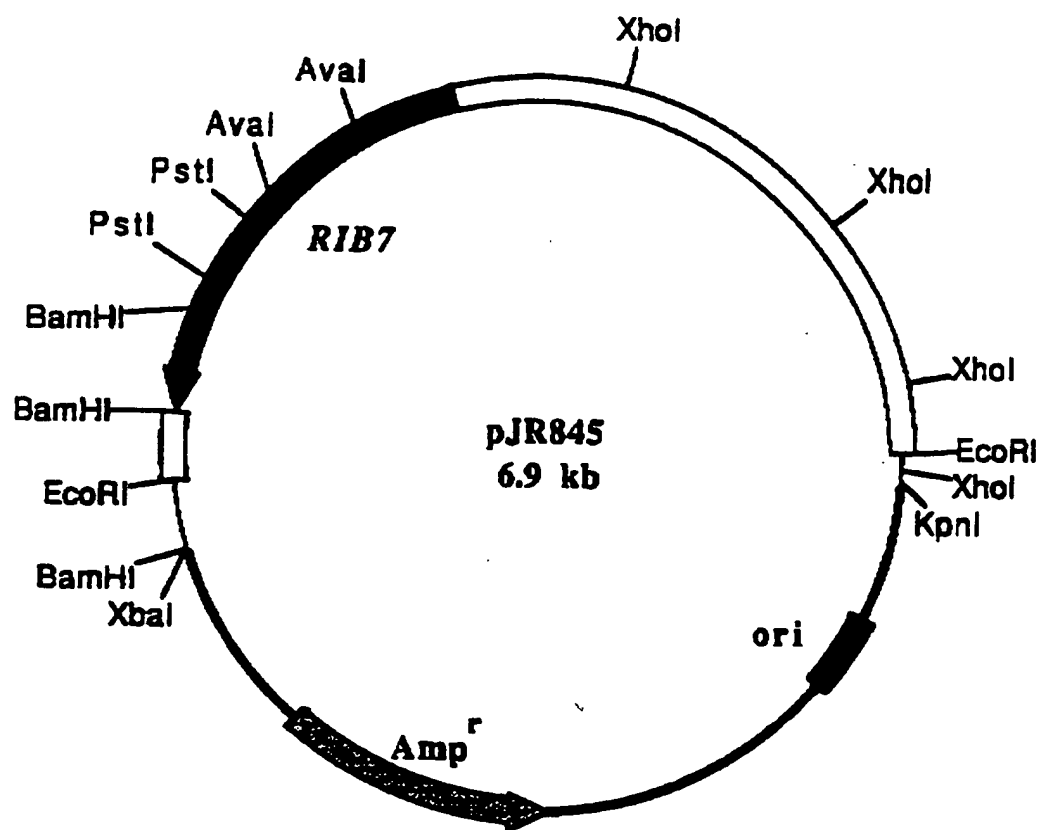


Fig. 7



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/EP 95/00958

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
IPC 6 C12N15/52 C12N15/53 C12N15/54 C12N15/55 C12N15/81  
C12N1/19 C12P25/00 //(C12N1/19,C12R1:865)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
IPC 6 C12N C12P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	YEAST, vol. 9, no. 10, October 1993 JOHN WILEY & SONS LTD., CHICHESTER, UK, pages 1099-1102, M.-J. BUITRAGO ET AL. 'Mapping of the RIB1 and RIB7 genes involved in the biosynthesis of riboflavin in Saccharomyces cerevisiae' see the whole document	1,6-9
X	--- YEAST (1993), 9(2), 189-99 CODEN: YESTE3;ISSN: 0749-503X, 1993 DOIGNON, FRANCOIS ET AL 'The complete sequence of a 19,482 bp segment located on the right arm of chromosome II from Saccharomyces cerevisiae' see the whole document --- -/--	5,7-9

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

### \* Special categories of cited documents :

- \*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \*E\* earlier document but published on or after the international filing date
- \*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- \*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- \*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- \*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- \*&\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

29 June 1995

Date of mailing of the international search report

29.08.95

Name and mailing address of the ISA  
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax (+ 31-70) 340-3016

Authorized officer

Hillenbrand, G

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/EP 95/00958

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP,A,0 405 370 (F. HOFFMANN-LA ROCHE AG) 2 January 1991 cited in the application see the whole document ---	1-9
X	EP,A,0 569 806 (BASF) 18 November 1993 see the whole document ---	5,7-9
P,X	WO,A,94 11515 (BASF) 26 May 1994 see the whole document -----	1-9

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP 95/00958

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP-A-0405370	02-01-91	CN-A- 1049185 JP-A- 3117489	13-02-91 20-05-91
EP-A-0569806	18-11-93	JP-A- 6022765	01-02-94
WO-A-9411515	26-05-94	DE-A- 4238904	26-05-94

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internation: Vktenzeichen

PCT/EP 95/00958

## A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 6 C12N15/52 C12N15/53 C12N15/54 C12N15/55 C12N15/81  
C12N1/19 C12P25/00 //(C12N1/19,C12R1:865)

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 6 C12N C12P

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	YEAST, Bd. 9, Nr. 10, Oktober 1993 JOHN WILEY & SONS LTD., CHICHESTER, UK, Seiten 1099-1102, M.-J. BUITRAGO ET AL. 'Mapping of the RIB1 and RIB7 genes involved in the biosynthesis of riboflavin in Saccharomyces cerevisiae' insgesamt ---	1,6-9
X	YEAST (1993), 9(2), 189-99 CODEN: YESTE3;ISSN: 0749-503X, 1993 DOIGNON, FRANCOIS ET AL 'The complete sequence of a 19,482 bp segment located on the right arm of chromosome II from Saccharomyces cerevisiae' insgesamt --- -/-	5,7-9

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

\* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

29. Juni 1995

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

29.08.95

Name und Postanschrift der Internationale Recherchenbehörde  
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Hillenbrand, G

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

International: Vktenzeichen

PCT/EP 95/00958

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	EP,A,0 405 370 (F. HOFFMANN-LA ROCHE AG) 2.Januar 1991 in der Anmeldung erwähnt insgesamt ---	1-9
X	EP,A,0 569 806 (BASF) 18.November 1993 insgesamt ---	5,7-9
P,X	WO,A,94 11515 (BASF) 26.Mai 1994 insgesamt -----	1-9

**INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT**

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internation Aktenzeichen

PCT/EP 95/00958

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
EP-A-0405370	02-01-91	CN-A- 1049185	13-02-91
		JP-A- 3117489	20-05-91
EP-A-0569806	18-11-93	JP-A- 6022765	01-02-94
WO-A-9411515	26-05-94	DE-A- 4238904	26-05-94